

ZEITSCHRIFT FÜR BIOLOGIE

Unter Mitarbeit von

R. Dittler, Marburg a. d. L. - A. Jarisch, Innsbruck - L. Lendle, Göttingen - H. Lieb, Graz
H. Lullies, Homburg a. d. Saar - H. Schaefer, Bad Nauheim - F. Scheminzky, Innsbruck
H. Schriewer, Mainz - E. Schütz, Münster - H. Weber, Tübingen - K. Wezler, Frankfurt/M.
E. Wöhlisch, Würzburg

herausgegeben von

A. W. FORST - A. HAHN - B. ROMEIS - R. WAGNER

103. BAND · 1. HEFT

1949



URBAN & SCHWARZENBERG · BERLIN UND MÜNCHEN

ZEITSCHRIFT FÜR BIOLOGIE

Inhalt von Band 103, Heft 1

<i>Hahn, Amandus</i> , Das vorteilhafteste System, die Hemmung der Milchsäurebildung im Muskel durch Sauerstoff zu untersuchen (mit 11 Tabellen)	1
<i>Hahn, Amandus</i> , Über falsche Anwendung des Begriffes: Gekoppelte Reaktion . .	11
<i>Duttenhöfer, Herta</i> , Zur Überführung von Acetessigsäure in β -Oxybuttersäure durch Hefe (mit 7 Tabellen)	17
<i>Thoma, Karl</i> , Ribonukleinsäure in den weißen Formelementen des Blutes und des Knochenmarkes (mit 6 Abbildungen)	27
<i>Dittler, R.</i> und <i>G. Billing</i> , Über eine Periodik der Erregbarkeitsänderung im abklingenden Anelektrotonus (mit 6 Abbildungen)	45
<i>Josenhans, Gerhard</i> , Konstruktion und Empfindlichkeitsanalyse eines Dynamometers nach dem Prinzip von Wöhlisch (mit 2 Abbildungen und 2 Tabellen)	55
<i>Josenhans, Wilhelm</i> , Der thermokinetische und potentielle Anteil der Elastizität des Froschmuskels (mit 5 Abbildungen und 1 Tabelle)	61
<i>Brecht, K.</i> und <i>H. Kaumanns</i> , Über biologische Wirkungen extremer Acetylcholinverdünnungen (mit 6 Abbildungen und 1 Tabelle)	69
<i>Wöhlisch, Edgar</i> , Zur Definition des Begriffes der Schlafentiefe (mit 1 Tabelle) . . .	81
<i>Niemer, Helmut</i> , Versuche mit radioaktivem Phosphor (mit 2 Tabellen)	87

Schriftleitung: Prof. B. Romeis, Institut für Histologie und experimentelle Biologie, München 15, Pettenkoferstr. 11, Tel.: 20 1 02.

Manuskripte sind zu schicken:

von Arbeiten experimentell-biologischen Inhalts an Prof. Benno Romeis,
von Arbeiten physiologischen Inhalts an Prof. Richard Wagner, Physiologisches Institut, München 15, Pettenkoferstr. 11, Tel.: 34 3 35,
von Arbeiten physiologisch-chemischen Inhalts an Prof. Amandus Hahn, Physiologisch-Chemisches Institut, München 15, Pettenkoferstr. 11, Tel.: 34 3 35.
von Arbeiten pharmakologischen Inhalts an Prof. August Wilhelm Forst, Pharmakologisches Institut, München 15, Nußbaumstr. 7, Tel.: 73 8 35.

Manuskripte: Zur Veröffentlichung kommen nur Originalarbeiten und wissenschaftliche Kurzmitteilungen. Die Originalarbeiten sollen möglichst 3 Druckbogen und die wissenschaftlichen Kurzmitteilungen 2 Druckseiten nicht überschreiten.

Die Manuskripte sind einseitig mit Schreibmaschine zu schreiben. Beigefügte Abbildungen, graphische Darstellungen und Tabellen müssen auf der Rückseite den Namen des Verfassers und der Arbeit aufweisen. Literaturangaben sind jeweils an den Schluß der Arbeit zu setzen und zwar einheitlich, wie folgt: Nachname des Verfassers, Anfangsbuchstabe des Vornamens, Name der Zeitschrift in wissenschaftlicher Abkürzung, Band, Seite, Jahreszahl. Bei Literaturangaben von Büchern folgen auf den Verfassernamen der Titel des Buches, Auflage, Ort, Verlag, Jahreszahl, Seite.

Honorar: Das Honorar beträgt DM 40.— je Druckbogen. Mehr als 3 Druckbogen je Arbeit werden nicht honoriert.

Sonderdrucke: Die Verfasser erhalten gemeinsam 40 Sonderdrucke unberechnet. Darüber hinaus werden Sonderdrucke zu einem Unkostenbeitrag angefertigt, sofern ihre Bestellung bei Rücksendung der Korrektur erfolgt ist.

Erscheinungsweise: Die Zeitschrift erscheint vierteljährlich. Jeweils 4 Hefte bilden einen Band. Jedes Heft hat einen Umfang von durchschnittlich 10 Druckbogen.

Bezugspreis: Jedes Heft wird im Rahmen des Band-Abonnements einzeln berechnet.

Der Verlag behält sich für die veröffentlichten Beiträge alle Rechte, auch die des Nachdruckes gegen Quellenangabe, der photomechanischen Wiedergabe und der Übersetzung, vor.

Preis dieses Heftes: im Abonnement DM 12.60, einzeln DM 14.—

Das vorteilhafteste System, die Hemmung der Milchsäurebildung im Muskel durch Sauerstoff zu untersuchen

Von Amandus Hahn *)

Mit Versuchen von R. und B. Friedrich

Eingegangen am 3. April 1948

Zur Untersuchung der Hemmung, die Sauerstoff auf die Milchsäurebildung im Muskel ausübt, wurde in unserem Laboratorium zuerst Warmblütermuskel benutzt¹. Vorher waren die Versuche, vor allem von *Meyerhof*, mit Froschmuskel angestellt worden. Wie schon frühere Untersuchungen ergeben haben², ist gerade der Froschmuskel hierfür *nicht* geeignet; auch die vorliegende Arbeit zeigt dies wieder. Die häufig sich widersprechenden Angaben über den Einfluß des Sauerstoffs auf die Milchsäurebildung im Muskel bei den verschiedenen Autoren ist fast stets auf das benutzte ungeeignete Versuchsmaterial zurückzuführen. Natürlich ist es an sich interessant, daß bei den verschiedenen Tierarten die Muskulatur sich verschieden verhält; will man aber dem *Mechanismus* der hemmenden Wirkung des Sauerstoffs auf die Spur kommen, so muß man ein System benutzen, in dem das Phänomen leicht und einwandfrei zu beobachten ist. Dies ist bei allen bis jetzt untersuchten Muskeln nur bei *Rinder-* und *Pferdemuskel* der Fall, die wir deshalb auch immer benutzt haben.

Zur Versuchsanordnung habe ich nichts Neues hinzuzufügen, nur möchte ich auf das prinzipiell Wichtige nochmals hinweisen. Die Digestion des zerkleinerten Muskels erfolgte stets in derselben *Phosphatpufferlösung* (m/22,5; pH = 7) in den früher angegebenen Gläsern (im Vakuum oder in Sauerstoff) unter Schütteln unter dem Wasser eines Thermostaten von 35°. Die Bestimmung der Milchsäure wurde nach der Methode von *Cotonio*, *Shaffer* und *Friedemann*³ vorgenommen. Die gelegentlich benutzte Mikromethode der Milchsäurebestimmung von *Fuchs* haben wir in einigen Punkten modifiziert⁴. Die Zerkleinerung der Muskulatur geschah durch eine gewöhnliche Fleischmaschine, für die Scheiben mit besonders kleinem Durchmesser der Löcher (1,5 mm) hergestellt wurden, oder mit der Laptiemühle. In einigen Fällen wurde auch die Zerkleinerung mit der Schere in einer Glasschale vorgenommen, oder, wenn man mit größeren, aber dünnen Gewebsschnitten arbeiten wollte, Schnitzel mit einer Rasierklinge hergestellt.

1. Versuche mit Rinder- und Pferdemuskel

Die Muskulatur wurde auf dem Schlachthof dem frisch geschlachteten Tier entnommen, an welcher Stelle, ist jeweils bei der Schilderung der Versuche bemerkt.

*) Herrn Professor Dr. B. Romeis zu seinem 60. Geburtstag.

Der Transport geschah auf Eis in einer Thermosflasche. Wenn nötig, wurde im Institut im Eisschrank, auf Eis liegend der Muskel vor der Zerkleinerung so lange gekühlt, bis er sich ganz kalt anfühlte. Bei allen Warmblütermuskeln ist die Zerkleinerung *gekühlter* Muskulatur von größter Bedeutung. Etwa $\frac{1}{2}$ Std. nach Schlachten des Tieres begannen die Versuche. Die Dauer der Digestion im Vakuum oder in Sauerstoff betrug stets 2 Std.

a) Versuche mit Zerkleinerung durch Fleischmaschine

Die Versuche mit *Pferdemuskelbrei* findet man in Tabelle 1.

Tabelle 1
Versuche mit 5 g *Pferdemuskel*
Die Zahlen bedeuten mg Milchsäure

Versuche	1.	2.	3.	4.	5.
Direkt . . .	10.44	7.02	17.28	6.72	16.45
Digertiert im Vakuum . .	57.20	54.71	26.86	32.93	56.16
Digertiert in Sauerstoff .	13.20	12.94	19.86	29.16	15.03

Versuch 1 und 2 Muskulatur vom Schlegel; Versuch 3 Bauchmuskulatur; Versuch 4 Muskel vom Oberschenkel; Versuch 5 Halsmuskulatur.

Man erkennt die Zunahme der Milchsäuremenge im *Vakuum* gegenüber dem Nullversuch, sowie die starke Hemmung der Milchsäurebildung bei Digestion mit *Sauerstoff*, die in Versuch 5 total, in 1, 2 und 3 beinahe vollständig war.

Die Resultate mit *Rindermuskel* enthält Tabelle 2.

Tabelle 2
Versuche mit 5g *Rindermuskel*
Die Zahlen bedeuten mg Milchsäure

Versuche	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
Direkt . . .	12.85	7.08	10.04	9.05	4.93	11.18	10.03	10.21	7.73	7.39
Digertiert im Vakuum .	42.50	43.48	15.64	15.32	37.48	43.88	39.77	56.24	68.36	38.13
Digertiert in Sauerstoff	18.13	16.80	10.46	11.36	12.82	23.16	34.64	22.89	25.80	21.53

Versuch 1 u. 2 Halsmuskulatur; Versuch 3 u. 4 Lendenmuskulatur; Versuch 5 bis 10 Muskulatur des Schlegels

Die Zunahme der Milchsäure im *Vakuum* ist meist sehr bedeutend. In Versuch 3 blieb die Milchsäure bei Digestion mit *Sauerstoff* konstant, bei Versuch ; und 4 ist dieses Verhalten beinahe erreicht.

Die Resultate der Tabellen 1 und 2 bestätigen, was wir in vielen früheren Veröffentlichungen bei zahlreichen Versuchen gezeigt haben.

Zum Studium der hemmenden Wirkung des Sauerstoffes auf die Milchsäurebildung im Muskel sollte man stets Rinder- oder Pferdemuskel benutzen.

b) Versuche mit Zerkleinerung durch die Latapiemühle

Da von mancher Seite behauptet worden ist, daß der Zerkleinerungsgrad des Muskels bei dem in Frage kommenden Phänomen eine Rolle spiele, und zwar in dem Sinn, daß bei sehr starker Zerkleinerung die hemmende Wirkung des Sauerstoffs auf die Milchsäurebildung abnehme⁵, haben wir bei *Pferdemuskel* zwei verschiedene Zerkleinerungsgrade verglichen. Neben der Zerkleinerung durch die Fleischmaschine wurde die viel feinere mit der daran anschließenden durch die *Organmühle von Latapie* vorgenommen (Tab. 3).

Zunächst ergibt sich, daß bei jeder Art der Zerkleinerung die beim *direkten* Versuch gefundene Milchsäure ungefähr gleich ist, obwohl der Akt der Zerkleinerung und die mechanische Beeinflussung bei nachfolgender Behandlung mit der Latapiemühle länger dauert. Dies ist eine Folge der guten vorherigen Kühlung der Muskulatur vor der Zerkleinerung auf Eis. Bei höherer Außentemperatur lagen oft die Fleischmaschine und die Organ-

Tabelle 3

Versuche mit 5 g Pferdemuskel

Die Zahlen bedeuten mg Milchsäure

a. zerkleinert mit Fleischmaschine

b. zerkleinert mit Fleischmaschine und darauffolgende Zerkleinerung mit Organmühle nach Latapie

Versuche	1.		2.		3.		4.	
	a	b	a	b	a	b	a	b
Direkt . . .	7.65	12.65	14.41	10.55	10.20	10.87	11.08	11.90
Digertiert im Vakuum . .	39.64	39.40	29.22	22.68	44.80	45.78	68.18	60.60
Digertiert in Sauerstoff .	22.39	17.17	17.57	17.25	28.24	19.93	25.61	30.14
Versuche	5.		6.		7.			
	a	b	a	b	a	b		
Direkt . . .	10.55	13.51	13.44	12.35	10.71	19.55		
Digertiert im Vakuum . .	63.74	61.60	55.17	63.40	52.54	56.10		
Digertiert in Sauerstoff .	21.24	24.46	31.12	36.23	16.64	34.25		

Versuch 1 Halsmuskulatur; Versuch 2 Muskulatur des Oberschenkels;
Versuch 3 bis 7 Muskulatur des Schlegels.

mühle nach *Latapie* über Nacht im Eisschrank, damit auch durch die Zerkleinerungsapparate keine Zufuhr von Wärme erfolgte. Auch nach Digestion im *Vakuum* ist in beiden Fällen kein wesentlicher Unterschied der gebildeten Milchsäuremenge. Die Hemmung der Milchsäurebildung durch *Sauerstoff* ist nur in *einem* Fall (Versuch 7 b) bei dem stärker zerkleinerten Muskel geringer als im weniger stark zerkleinerten. In den übrigen Versuchen weicht der Wert von a und b nach beiden Seiten vom Mittel ab.

Von einer Herabsetzung der hemmenden Wirkung des Sauerstoffs auf die Milchsäurebildung durch weitergehende Zerkleinerung ist nichts zu beobachten.

c) Versuche in physiologischer Kochsalzlösung

Es war kaum anzunehmen, daß der Phosphatpuffer die zu untersuchenden Vorgänge *prinzipiell* beeinflußt hatte. Immerhin waren Versuche, die anstelle des Phosphates physiologische Kochsalzlösung enthielten, nicht ohne Interesse (Tab. 4). Die Zerkleinerung erfolgte hierbei durch die Fleischmaschine.

Tabelle 4

Versuche mit 5 g Muskel

Die Zahlen bedeuten mg Milchsäure

Versuche	1.	2.	3.
Direkt . . .	6.48	7.38	13.14
Digiert im Vakuum .	13.68	12.78	24.48
Digiert in Sauerstoff	4.86	7.74	10.98

Versuch 1 Rindermuskel; Versuch 2 und 3
Pferdemuskel

Das Resultat ist dasselbe wie immer: Milchsäurebildung im Vakuum und deren Hemmung durch Sauerstoff. Daß die Milchsäurebildung im Vakuum so viel geringer als in den Versuchen mit Phosphatpuffer ist, war zu erwarten. Die nicht gepufferte Lösung wird infolge der Milchsäurebildung sauer. Daß saure Reaktion das Fermentsystem schädigt, das aus Muskelglykogen Milchsäure bildet, ist längst bekannt. Es braucht wohl kaum betont zu werden, daß Versuche über die Hemmung der Milchsäurebildung im Muskel durch Sauerstoff nur in einer gut gepufferten Lösung gemacht werden dürfen.

2. Versuche mit Muskeln von Ratte und Meerschweinchen

Die Muskeln wurden nach Kühlung in einer auf Eis stehenden Glasschale mit einer Schere zu einem feinen, homogenen Brei zerkleinert. Die Zusammensetzung der Ansätze war dieselbe wie bei Versuchen mit Rinder- und Pferdemuskel.

Das Resultat der Versuche mit *Rattenmuskeln* enthält Tabelle 5.

Tabelle 5

Versuche mit 5 g Rattenmuskel

Die Zahlen bedeuten mg Milchsäure

Versuche	1.	2.	3.	4.
Direkt . . .	13.64	18.08	19.20	23.55
Digiert im Vakuum . .	32.38	33.86	31.23	37.08
Digiert in Sauerstoff .	23.17	27.60	29.09	33.58

In Tabelle 6 findet man die Versuche mit *Meerschweinchenmuskulatur*. Sie wurde, wie auch bei Ratten, den Schenkeln entnommen. Solche Versuche wurden, wie schon erwähnt, bereits von *Kutscher* und *Sarreither*⁶ angestellt.

Tabelle 6
Versuche mit 5 g Meerschweinchenmuskel

Die Zahlen bedeuten mg Milchsäure

Versuche	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
Direkt . . .	17.72	11.77	14.32	17.36	9.36	17.80	14.31
Digiert im Vakuum . .	51.48	43.49	40.86	40.00	33.08	45.20	33.30
Digiert in Sauerstoff .	37.19	33.01	29.68	35.64	25.22	40.40	28.51

Bei den untersuchten Nagetieren ist die Milchsäurebildung im *Vakuum* von derselben Größenordnung wie bei Pferd und Rind. Die Hemmung der Milchsäurebildung durch *Sauerstoff* ist in einigen Fällen (Tab. 5, Nr. 1; Tab. 6, Nr. 1, 2, 3) sehr gut, in anderen Fällen gering. Jedenfalls ist das Phänomen der Hemmung wesentlich unregelmäßiger zu beobachten als bei Rinder- und Pferdemuskel. Obwohl naturgemäß die Muskulatur bei den untersuchten Nagetieren viel rascher nach dem Tod des Tieres zu den Versuchen benutzt werden kann, als bei Rind und Pferd, eignet sie sich doch weniger als diese zu den einschlägigen Versuchen. Die Muskulatur von Rind und Pferd ist deshalb für die Untersuchungen so wertvoll, weil es nur durch sehr langes Lagern unter besonderen Bedingungen gelingt, die hemmende Wirkung des Sauerstoffs auf die Milchsäurebildung zum Verschwinden zu bringen.

Um die Natur der hemmenden Wirkung des Sauerstoffs auf die Milchsäurebildung im Muskel zu studieren, sollte man von den bis jetzt untersuchten Tieren nur die Muskulatur von Pferd und Rind verwenden, da das Phänomen hier ganz regelmäßig auftritt und beim Altern des Muskels nur sehr langsam verschwindet.

Irgend welche theoretischen Schlüsse über das Wesen der hemmenden Wirkung des Sauerstoffs auf die Milchsäurebildung in der Muskulatur sollte man bei Benutzung der Muskulatur anderer Tiere unterlassen, sofern nicht eine Tierart gefunden wird, die sich genau so verhält wie Pferd und Rind.

3. Versuche mit Froschmuskulatur

Versuche mit Muskulatur vom *Frosch* sind schon früher in unserem Laboratorium gemacht worden⁷.

a) Versuche bei Zerkleinerung durch die Schere

Alle Versuche mit Muskulatur von *Rana temporaria* wurden während der Monate Dezember bis März angestellt. Die sogenannten „Sommerfrösche“ sind wegen der Glykogenarmut der Muskulatur zu derartigen Versuchen nicht brauchbar. In den

Experimenten der früheren Arbeit wurde, ebenso wie in den jetzt angestellten Versuchen, die Gesamtmuskulatur der hinteren Extremitäten verwandt. Auf einer in Eis stehenden Glasschale wurde mit einer Augenschere ein homogener Muskelbrei hergestellt, um die Zerkleinerung in der Kälte vorzunehmen.

Tabelle 7 enthält das Resultat der Versuche mit *Nierner* und *Meisner* (Digestion bei 25°).

Tabelle 7
Versuche mit 5 g Froschmuskel
Die Zahlen bedeuten mg Milchsäure
Temp. 25°

Zeit	1.		Zeit	2.	
	Vakuum	Sauerstoff		Vakuum	Sauerstoff
Direkt . . .	9.35	—	Direkt . . .	9.2	—
15 Min. . . .	13.9	9.8	20 Min. . . .	16.5	13.4
60 Min. . . .	25.8	21.8	30 Min. . . .	21.9	18.5
120 Min. . . .	25.2	24.2	60 Min. . . .	26.1	25.1

Aus Tabelle 7 geht hervor, daß bei Digestion im *Vakuum* eine kräftige Milchsäurebildung erfolgt, die in Versuch 1 schon nach 60 Min. ihr Maximum erreicht hat. In den Versuchen mit *Sauerstoff* beobachtet man nach $\frac{1}{4}$ und $\frac{1}{2}$ Stunde deutlich dessen hemmende Wirkung. In Versuch 1 ist sie auch nach 1 Std. festzustellen. *Die hemmende Wirkung nimmt mit der Zeit ab*, so daß sie nach 2 Std. nicht mehr nachweisbar ist; hier ist praktisch Gleichheit der Milchsäurewerte im Vakuum und mit Sauerstoff eingetreten.

Neuerdings in entsprechender Weise mit Froschmuskel angestellte Versuche, wobei die Digestion bei 35° erfolgte, enthält Tabelle 8.

Das Resultat dieser Versuche ist prinzipiell dasselbe wie in den früheren. *Die hemmende Wirkung des Sauerstoffs auf die Milchsäurebildung nimmt mit der Versuchsdauer ab*. Man erkennt dies am besten, wenn man die bei

Tabelle 8
Versuche mit 5 g Froschmuskel
Die Zahlen bedeuten mg Milchsäure
Temp. 35°

Versuche	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
Direkt . . .	6.5	5.8	5.2	4.5	6.2	5.2	6.2	6.2
Digiert im Vakuum .	39.8	41.6	46.8	44.7	23.9	18.8	14.2	10.6
Digiert in Sauerstoff	34.7	41.1	40.7	31.2	12.7	10.1	6.1	7.5
Dauer	2 h	2 h	2 h	2 h	$\frac{3}{4}$ h	$\frac{1}{2}$ h	$\frac{1}{4}$ h	$\frac{1}{4}$ h

Gegenwart von Sauerstoff weniger gebildete Menge Milchsäure in Prozenten der im parallel verlaufenden Vakuumversuch insgesamt gebildeten Milchsäure ausdrückt. Man erhält so für die *Langversuche* (Digestion 2 Std.):

Versuch:	1	2	3	4
Hemmung:	12,8 ‰	0 ‰	10,9 ‰	30,4 ‰

Für die Kurzversuche:

Versuch:	5	6	7	8
Hemmung:	46,9 ‰	46,6 ‰	56,4 ‰	28,3 ‰

Die Werte liegen also bei Kurzversuchen höher, als Beweis für die stärkere Hemmungswirkung des Sauerstoffs bei kurzdauernden Versuchen.

Es ergibt sich hieraus, daß auch der *Froschmuskel* zum Studium der hemmenden Wirkung des Sauerstoffs auf die Milchsäurebildung nicht geeignet ist. Obwohl er sehr rasch nach dem Tod des Tieres erhalten werden kann, nimmt durch irgend einen, seinem Wesen nach unbekannten Vorgang, die hemmende Wirkung viel rascher ab, als bei Rinder- und Pferdemuskel.

b) Versuche mit Muskelschnitten

Um eine weniger starke Zerkleinerung zu bekommen, wurde der Muskel mit einer Rasierklinge in hauchdünne Schnitte zerlegt. Bei einiger Übung gelingt es, auf diese Weise 3 g Muskel in 20 Minuten in Form solcher Schnitte zu erhalten. Die fertigen Schnitte werden sofort auf ein in Eis stehendes Uhrschälchen gelegt, um den Beginn der Milchsäurebildung vor Ansatz des Versuches möglichst zu verhindern. Die Einzelversuche waren jeweils mit 1 g Muskelschnitten angesetzt. Die Milchsäurebestimmung erfolgte nach der eingangs angegebenen Mikromethode.

Tabelle 9 enthält die Resultate.

Tabelle 9
Versuche mit 1g Froschmuskel-Schnitte

Die Zahlen bedeuten mg Milchsäure

Versuche	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
Direkt . . .	3.0	3.1	1.9	1.5	2.3	4.3	2.1	2.7	2.2
Digiert im Vakuum .	11.1	8.0	9.7	8.3	8.2	6.1	6.1	7.0	7.0
Digiert in Sauerstoff	10.4	7.9	5.5	7.2	6.6	5.6	7.7	5.7	5.0
Dauer . . .	2 h	2 h	2 h	2 h	$\frac{3}{4}$ h	$\frac{3}{4}$ h	$\frac{3}{4}$ h	$\frac{3}{4}$ h	$\frac{3}{4}$ h

Die Versuche der Tabelle 9 ergeben prinzipiell nichts Neues. Die hemmende Wirkung des Sauerstoffs ist angedeutet, aber auch bei Kurzversuchen schwächer als bei mit der Schere zerkleinertem Muskel. Es liegt dies offenbar daran, daß bei der Herstellung der Rasiermesserschnitte die eigentlichen Versuche 20 Minuten später beginnen, als bei Vorbehandlung mit der Schere. In dieser Zeit hat im allgemeinen die hemmende Wirkung durch irgend eine Veränderung in der Muskulatur schon ziemlich abgenommen. Eine Verbesserung der hemmenden Wirkung des Sauerstoffs durch weniger feine Zerteilung des Muskels ist nicht festzustellen.

4. Versuche mit Warmblüter-Herzmuskel

Bei Verwendung eines Breies von *Pferdeherz*-Muskel ist die Milchsäurebildung bei 2-Std.-Versuchen im *Vakuum* gerade eben angedeutet. Sie betrug im Mittel bei 9 Versuchen 2 mg in 5 g Muskel. Der Zusatz von 1 % Glukose verbesserte hieran nichts. Wie bei dieser geringen Zunahme der Milchsäure im *Vakuum* zu erwarten war, kam eine hemmende Wirkung des *Sauerstoffs* in Parallelversuchen nicht zur Beobachtung, sie fällt innerhalb der Fehlergrenze.

Die Versuche mit Muskelbrei von *Rinderherz* enthält Tabelle 10. (Dauer der Digestion: 2 Std.)

In den Versuchen 2, 3, 4 ist die Milchsäurebildung im *Vakuum* deutlich, aber viel geringer als bei Skelettmuskulatur des Rindes, eine Tatsache, auf die schon in einer früheren Arbeit⁸ hingewiesen wurde. In den Versuchen

Tabelle 10
Versuche mit 5 g Herzmuskel vom Rind
Die Zahlen bedeuten mg Milchsäure

Versuche	1.	2.	3.	4.
Direkt . . .	14.5	23.6	22.5	17.8
Digiert im Vakuum . .	16.7	27.5	27.5	26.7
Digiert in Sauerstoff .	11.6	23.1	18.6	17.8

2 und 4 hat die Gegenwart von *Sauerstoff* zu einer absoluten Hemmung der Milchsäurebildung geführt. Bei Versuch 3 ist der Milchsäurewert bei Digestion mit *Sauerstoff* deutlich niedriger als der Nullwert. Das gleiche Verhalten zeigt im Versuch 1, wo die Zunahme der Milchsäure im *Vakuum* sehr gering ist. Die Abnahme der Milchsäure unter den Anfangswert wird wohl eine Folge von Oxydation sein.

5. Versuche mit glatter Muskulatur von Warmblütern

Die Versuche wurden jeweils mit 5 g Brei aus der glatten Muskulatur des *Magens* (Cardia oder Pylorus) angestellt. In 9 Versuchen war die Milchsäurebildung im *Vakuum* höchstens angedeutet. Zusatz von Glukose in einer Konzentration von 1 % verbesserte hieran nichts. Wie zu erwarten, fällt die hemmende Wirkung des *Sauerstoffs* innerhalb der Fehlergrenze.

6. Versuche mit stehengelassener Rindermuskulatur

Während im Frosch- und Nagetiermuskelbrei die hemmende Wirkung des *Sauerstoffs* auf die Milchsäurebildung rasch abnimmt, bedarf es bei Pferde- und Rindermuskel erst sehr langen Stehens, damit dieser Effekt zur Beobachtung kommt. Daß sogar das völlige Verschwinden der hem-

menden Wirkung beim Muskel von Rind erreicht werden kann, wurde von *Hahn* und *Niemer*⁹ zuerst gezeigt. Die Vorbehandlung des Muskelbreis wurde später etwas vereinfacht¹⁰. Nach dieser Vorschrift wurde auch in den im Folgenden geschilderten Versuchen verfahren. Das Resultat enthält Tabelle 11.

Tabelle 11
Versuche mit 5 g Rindermuskel

Die Zahlen bedeuten mg Milchsäure
Lagerung des Breies 5 h.

Versuche	1.	2.	3.	4.	5.
Direkt . . .	19.2	36.0	34.0	21.8	31.0
Digiert im Vakuum . .	40.1	64.4	58,5	24.8	55.8
Digiert in Sauerstoff .	32.4	62.1	56.4	23.0	55.8

Nur bei Versuch 1 ist eine, nicht sehr starke Verminderung der Milchsäurebildung mit Sauerstoff zu beobachten. Bei den übrigen Versuchen ist praktisch die Milchsäuremenge im Vakuum- und Sauerstoff-Versuch dieselbe.

Daß gezeigt wurde¹⁰, daß die hemmende Wirkung des Sauerstoffs durch Stoffe, die im *Waschsaft* des Muskels enthalten sind, bei einem in oben angegebener Weise vorbehandelten Muskelbrei wieder hergestellt werden kann und daß dabei die Atmungsgröße des Muskelbreis *nicht* gesteigert wird, ist von *theoretischer Bedeutung*. Die letztgenannte Beobachtung *schließt* die Deutung der hemmenden Wirkung des Sauerstoffs auf die Milchsäurebildung, wie sie von *Meyerhof* gemacht worden ist, absolut sicher *aus*.

7. Einige allgemeine Bemerkungen

Die vorliegende Untersuchung hat lediglich den *praktischen* Zweck zu zeigen, daß von den bis jetzt untersuchten Tierarten nur die Skelettmuskeln von *Rind* und *Pferd* zu Untersuchungen über das Wesen der hemmenden Wirkung des Sauerstoffs auf die Milchsäurebildung im Muskel zu brauchen sind.

Willstätter und *Rohdewald*¹¹ haben auf Grund von nicht einwandfrei angelegten Versuchen die Annahme gemacht, daß im *frischen* Muskel kein Unterschied in der Milchsäurebildung im Vakuum und mit Sauerstoff vorhanden sei; dies trete erst bei einer Schädigung der Muskulatur ein. Nach unseren früheren und den vorliegenden Versuchen ist genau das *Gegenteil* der Fall. Die ursprünglich vorhandene Hemmungswirkung des Sauerstoffs geht bei Schädigung der Muskulatur verloren. Eine ausführliche Kritik der Anschauung von *Willstätter* und *Rohdewald* haben wir früher gegeben¹².

*Szent-Görgyi*¹³ hat auf Grund rein theoretischer Erörterungen die Annahme gemacht, daß Verbindungen der C₄-Reihe, und zwar *Fumarsäure* und *Oxalessigsäure*, die Ursache der hemmenden Wirkung des Sauerstoffs

auf die Milchsäurebildung wären. Diese Annahme haben wir experimentell widerlegt¹⁴. Näher auf die von Szent-Györgyi entwickelte Vorstellung einzugehen, erübrigt sich umso mehr, als durch eine, vor einigen Jahren gemachte Beobachtung, daß nämlich der Sauerstoff die Abspaltung der Phosphorsäure aus *Glyzerinsäurephosphorsäure* hemmt¹⁵, die Deutung auf ein ganz anderes Gebiet geschoben worden ist.

Zusammenfassung

Es wird gezeigt, daß zur Untersuchung der hemmenden Wirkung des Sauerstoffs auf die Milchsäurebildung in Muskel von den bis jetzt untersuchten Tierarten nur *Rind* und *Pferd* benutzt werden können.

Literatur

- 1 Hahn, Fischbach u. Niemer, Z. Biol. **91**, 53, (1930) - 2 Hahn, Niemer u. Meisner, Z. Biol. **100**, 358, (1940) - 3 Hahn, A., Einführung in die physiologisch-chemischen Arbeitsmethoden, München, 1936 - 4 Hahn u. Gerstenberger, Z. Biol. **100**, 82 (1940) - 5 Kutscher u. Sarreither, H. S., **265**, 152, (1940) - 6 Kutscher u. Sarreither, H. S., **265**, 152, (1940) - 7 Hahn, Niemer u. Meisner, Z. Biol. **100**, 358, (1940) - 8 Hahn u. Niemer, Z. Biol. **100**, 323, (1940) - 9 Hahn u. Niemer, Z. Biol. **98**, 527, (1938) - 10 Hahn, Niemer u. Gasseling, Z. Biol. **99**, 614, (1939) - 11 Willstätter u. Rohdewald, Enzymologia, Vol. **VIII**, Fasc. 1, (1940) - 12 Hahn, Niemer u. Meisner, Z. Biol. **100**, 358, (1940) - 13 Szent-Györgyi, H. S., **244**, 115, (1936) - 14 Hahn, Niemer u. Gasseling, Z. Biol. **99**, 614, (1939) - 15 Hahn, B. Friedrich u. R. Friedrich, Z. Biol., **101**, 458, (1943)

Aus dem physiologisch-chemischen Institut München

Über falsche Anwendung des Begriffes: Gekoppelte Reaktion

Von Amandus Hahn *)

Wenn man sich auf *isotherme* Vorgänge beschränkt, kann man dem 2. Hauptsatz die Form geben:

$$F_I - F_{II} \geq \sum a \quad (1.)$$

wo F_I und F_{II} die freie Energie des Systems in zwei verschiedenen Zuständen, $\sum a$ die vom System beim Übergang vom Zustand I. in den Zustand II. geleistete Arbeit bedeutet, ferner das Zeichen $>$ für irreversible, das Gleichheitszeichen für reversible Vorgänge gilt. Ist F_I größer als F_{II} , so bedeutet $F_I - F_{II}$ die beim Vorgang erfolgende Abnahme der freien Energie. Gleichung 1.) sagt aus, daß bei *isothermen* Prozessen die *Abnahme* der *freien* Energie *gleich* der vom System geleisteten Arbeit ist, wenn die Veränderungen *reversibel* sind, daß die *Abnahme* der *freien* Energie dagegen *größer* als die vom System geleistete Arbeit ist, wenn die Veränderungen *irreversibel* vor sich gehen.

In der angegebenen Form eignet sich der 2. Hauptsatz besonders zur Anwendung auf *chemische* Prozesse. Für diese bedeutet es keine Einschränkung prinzipieller Art, wenn man sich auf *isothermen* Ablauf beschränkt.

Bei den meisten chemischen Prozessen ist die Arbeitsleistung verschwindend klein im Verhältnis zum gesamten Energieumsatz. Auch stellt es keine prinzipielle Einschränkung dar, wenn man den Vorgang in einem geschlossenen Behälter, also ohne Leistung äußerer Arbeit, sich abspielen läßt. Man kann daher in Gl. 1.) setzen:

$$\sum a = 0 \quad (2.)$$

Da sich in der Natur nur *irreversible* Vorgänge wirklich abspielen, erhält man:

$$F_I - F_{II} > 0 \quad (3.)$$

*) Der Inhalt dieser Abhandlung wurde am 12. XI. 48 in der Bayerischen Akademie der Wissenschaften mitgeteilt.

D. h. Bei allen chemischen Reaktionen nimmt die freie Energie des Systems ab.

Damit ist nicht gesagt, daß man nicht durch besondere Versuchsbedingungen auch chemische Reaktionen als Teilreaktionen sich abspielen lassen kann, bei denen die freie Energie zunimmt. Der 2. Hauptsatz sagt in der obigen Form aus, daß in einem *geschlossenen* System, das heißt in einem System, das alle Körper enthält, die überhaupt eine Veränderung erleiden, die freie Energie abnimmt.

In manchen Fällen kann zu einem chemischen Vorgang I., der unter *Zunahme* der freien Energie abläuft, eine bestimmte chemische Reaktion II. angegeben werden, die *zwangsläufig* mit der ersten zugleich sich derart abspielt, daß bei der Reaktion II. die freie Energie stärker abnimmt, als sie bei der Reaktion I. zunimmt. Dann ist der Forderung des 2. Hauptsatzes, daß im gesamten System die freie Energie abnimmt, Genüge geleistet. Beide Vorgänge zusammen stellen eine *gekoppelte Reaktion* dar.

Als Beispiel sei die Bildung von Ozon bei der Oxydation von Phosphor angeführt.



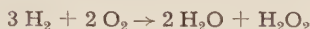
Die Bildung von Ozon aus Sauerstoff vollzieht sich unter Zunahme der freien Energie, geht also in der Natur nicht von selbst vor sich. Sie ist als *gekoppelte* Reaktion realisiert, weil mit ihr die Oxydation des Phosphors zu Trioxyd gleichzeitig abläuft. Die Abnahme der freien Energie bei der Oxydation des Phosphors ist größer, als deren Zunahme bei der Ozonbildung. Im Gesamtprozeß, den Gl. 4.) darstellt, nimmt somit die freie Energie ab, was nach dem 2. Hauptsatz die notwendige Bedingung für den Reaktionsablauf ist.

Ostwald¹ hat die charakteristischen Eigenschaften der *gekoppelten* Reaktionen angegeben. 1. Die Reaktion muß durch eine stöchiometrische Gleichung dargestellt werden können. 2. Der Reaktionsverlauf muß durch eine Gleichung beschrieben werden können, die sich *nicht* in mehrere von einander unabhängige Gleichungen zerlegen läßt. 3. In der Gleichung dürfen nur bestimmte, ganzzahlige Exponenten vorkommen, deren Größe eindeutig durch die Natur der Reaktionsgleichung gegeben, also nicht willkürlich, ist. Man sieht, daß diese Bedingungen für Gl. 4.) erfüllt sind.

Gerade das Kriterium, daß sich eine gekoppelte Reaktion nicht in mehrere von einander unabhängige Gleichungen zerlegen läßt, ist besonders einleuchtend. Es ist das Zeichen dafür: „daß die beiden Reaktionen von einander abhängig oder miteinander verkoppelt sind, so daß eine ohne die andere überhaupt nicht stattfinden kann.“ (Ostwald²)

Schon Ostwald hat auf folgendes hingewiesen. Man könnte etwa erwarten, daß die große Energieentwicklung bei der Bildung von Wasser aus seinen Elementen

zur gleichzeitigen Entstehung von Wasserstoffperoxyd führen könnte, indem die zur Entstehung des Peroxyds nötige Energie durch die Oxydation des Wasserstoffs zu Wasser geliefert würde. Man könnte den Vorgang etwa so formulieren:



Doch kann man diese Gleichung zerlegen in die Gleichungen zweier vollständig von einander *unabhängigen* Reaktionen:



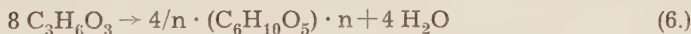
Es handelt sich somit *nicht* um eine gekoppelte Reaktion. In der Tat hat sich auch die Entstehung von Wasserstoffperoxyd bei der Oxydation von Wasserstoff zu Wasser nicht nachweisen lassen.

Bei vielen biochemischen Arbeiten ist die im vorhergehenden gegebene Definition nicht beachtet worden; noch immer werden fälschlicherweise biologische Vorgänge als gekoppelte Reaktionen bezeichnet, ohne es zu sein.

Ich habe schon im Jahre 1931³ dagegen Stellung genommen, daß nach *Meyerhof* der *Erholungsvorgang im Muskel* als *gekoppelte* Reaktion aufzufassen und damit rein chemisch zu erklären sei. *Meyerhof* nimmt an, daß beim Erholungsvorgang im isolierten Muskel, der sich nur bei Gegenwart von Sauerstoff abspielt, *ein* Mol Milchsäure vollständig oxydiert wird, damit in einer gekoppelten Reaktion vier Mole Milchsäure in Glykogen verwandelt werden. Die Bildung von Glykogen aus Milchsäure ist ein Vorgang, der unter Zunahme der freien Energie abläuft. Die von *Meyerhof* für die Erholung gegebene Gleichung der angeblich gekoppelten Reaktion:



läßt sich in die beiden unabhängigen Gleichungen 6.) und 7.) zerlegen:



und:



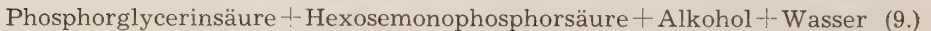
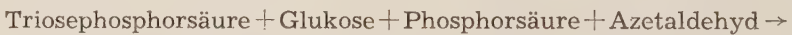
D. h.: Der durch die Gleichung 5.) dargestellte Erholungsvorgang ist *keine gekoppelte Reaktion*. Die durch die Gleichungen 6.) und 7.) wiedergegebenen Vorgänge haben garnichts miteinander zu tun; sie sind voneinander ganz unabhängig. Der Erholungsvorgang im Muskel läßt sich somit rein chemisch nicht erklären. Er ist ein komplizierter Lebensprozeß, dessen Zurückführung auf rein chemisches Geschehen z. Z. schon deshalb unmöglich ist, weil dabei die Struktur des Muskels von grundlegender Bedeutung ist, wie ich in experimentellen Untersuchungen zeigen konnte.⁴

In biologischen Systemen hat man in den letzten Jahren beobachtet, daß Oxydationsvorgänge zuweilen begleitet sind mit der *Bindung* von *Phosphorsäure* an organische Substanzen. In zellfreien Extrakten von *Lactobacillus delbrueckii* beobachtete z. B. *Lipmann* die Oxydation von Brenztraubensäure, wobei *Azetylphosphat*, eine sehr energiereiche Verbindung, entsteht. Man kann den Vorgang formulieren:



Er stellt eine *gekoppelte Reaktion* dar. Die Bildung des spontan sehr leicht zerfallenden Azetylphosphats vollzieht sich unter Zunahme der freien Energie. Der Prozeß läuft deshalb ab, weil er zwangsläufig gekoppelt ist mit der Oxydation der Brenztraubensäure zu Essigsäure. Da hierbei die freie Energie mehr abnimmt, als sie bei der Bildung von Azetylphosphat zunimmt, spielt sich der durch Gl. 8.) dargestellte Prozeß unter Abnahme der freien Energie ab. Die Gleichung läßt sich *nicht* in zwei voneinander unabhängige zerlegen, wie dies Verhalten für gekoppelte Reaktionen charakteristisch ist.

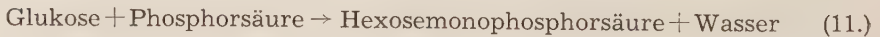
Gerade bei der Bindung von Phosphorsäure im Zellgeschehen sind die Ausdrücke *gekoppelte Reaktionen*, bzw. *Koppelung* zu Unrecht häufig benutzt worden und werden noch immer zu Unrecht angewandt. Das *Meyerhof*-sche Gärungsschema enthält z. B. die Gleichung:



Man kann sie in folgende beiden Gleichungen zerlegen, die zwei von einander ganz unabhängigen Reaktionen entsprechen:



und



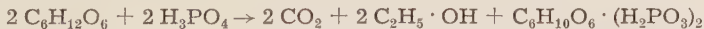
Daher sollte man in Bezug auf den Vorgang, der durch Gl. 9.) dargestellt ist, einen Satz, wie den folgenden vermeiden: „Auch hier besteht also die eigenartige Koppelung zwischen Dismutation und Phosphorylierung“⁵, denn beide Teilprozesse (Gl. 10. und 11.) sind ganz unabhängig voneinander und haben, von rein chemischem Gesichtspunkt betrachtet, gar nichts miteinander zu tun. Daß bei der Dismutation (Gl. 10.) in Hefe auch eine Bildung von Hexosemonophosphorsäure vor sich geht, ist ein biologischer Vorgang, dessen Notwendigkeit *chemisch* nicht einzusehen ist. Der Ablauf der beiden Vorgänge 10. und 11. nebeneinander ist bestenfalls die empirisch festgestellte Tatsache eines Lebensprozesses, wobei der innere Zusammenhang z. Z. chemisch nicht zu verstehen ist.

Der Prozeß der Gl. 10.) ist, was nur nebenbei erwähnt sei, eine gekoppelte Reaktion, wie jede Oxydoreduktion. Die Reduktion des Aldehyds zu Alkohol geht unter Zunahme der freien Energie vor sich. Sie findet nur statt, weil damit gekoppelt die Oxydation von Triosephosphorsäure zu Phosphorglycerinsäure abläuft.

Man hat in biologischen Systemen, wie schon erwähnt, häufiger eine Bindung von Phosphorsäure bei gleichzeitig ablaufendem Oxydationsprozeß beschrieben. Auch hier hat man ohne weiteres von „Koppelung“ und „gekoppelter Reaktion“ gesprochen, obwohl man nicht einmal wußte, welche organischen, Phosphorsäure enthaltende Verbindungen entstanden sind. Solange dies nicht der Fall ist und man die Entstehung der phosphorsäurehaltigen Verbindungen nicht mit dem Oxydationsprozeß durch *eine*, nicht in zwei Gleichungen zerlegbare Gleichung darstellen kann, ist dies nicht zulässig.

Man sollte von gekoppelter Reaktion und Koppelung nur sprechen, wenn es sich wirklich um eine Koppelung im Sinne der eingangs gegebenen Definition handelt. Wenn in Zellen oder Extrakten aus solchen irgendwelche Prozesse sich gleichzeitig abspielen, die man nicht zur Gleichung einer gekoppelten Reaktion vereinigen kann, so sollte man die Vorgänge getrennt formulieren, wodurch man ausdrückt, daß es sich hier um verschiedene Prozesse handelt, die in dem betreffenden System zwar gleichzeitig ablaufen, deren Gleichzeitigkeit aber man rein chemisch nicht erklären kann. Beobachtet man im speziellen einen biologischen Oxydationsvorgang und dabei eine Zunahme der organisch gebundenen Phosphorsäure, so kann man von einer gekoppelten Reaktion erst reden, wenn man den Nachweis erbracht hat, daß die Bindung der Phosphorsäure an ein bei der Oxydation entstandenes Produkt erfolgt ist. (Vergl. z. B. hierzu Gl. 8., die eine wirklich gekoppelte Reaktion darstellt, wo die Bindung der Phosphorsäure an die bei der Oxydation der Brenztraubensäure entstandene Essigsäure unter Bildung von Azetylphosphat erfolgt.)

Aber auch wenn man nicht von gekoppelter Reaktion redet, sollte man ähnliche Formel-Monstrositäten vermeiden, wie sie etwa in Form der sogenannten *Harden-Youngs* Gleichung der alkoholischen Gärung in biochemischen Betrachtungen ihr spukhaftes Dasein führen:



Hier hat man die Gleichungen zweier *chemisch vollständig von einander unabhängigen Reaktionen*, nämlich die einfache Gärungsgleichung



und die Gleichung einer *Phosphorylierung*



durch Addition zu einer Gleichung vereinigt. Richtiger wäre hier zu sagen, daß unter bestimmten Bedingungen (Mazerationssaft, Trockenhefe) neben der alkoholischen Gärung eine Bildung von Hexosediphosphorsäure in Erscheinung tritt; der chemische Zusammenhang ist hierbei unbekannt.

Kann man den gleichzeitigen Ablauf zweier Reaktionen in biologischem Material als eine gekoppelte Reaktion formulieren, so ist der gleichzeitige Ablauf klar und seine *Notwendigkeit* erwiesen. Ist diese Formulierung nicht möglich, so muß man sich darüber im Klaren sein, daß die Annahme eines speziellen biologischen Parallelvorganges mehr oder weniger willkürlich ist. In lebendem Material laufen zahllose Vorgänge zu gleicher Zeit nebeneinander ab, die man niemals alle kennt. Wer weiß, ob nicht ein unbekannter Vorgang viel eher als notwendiger Parallelvorgang aufzufassen ist, als gerade der, den man zufällig beobachtet hat.

Literatur

1 Ostwald, W., Z. f. physik. Chemie, **34**, 248, (1900) - 2 Ostwald, W., Grundlinien der anorgan. Chemie, II. Aufl., Leipzig, **1904**, 214 - 3 Hahn, A., Z. f. Biol. **91**, 44, (1931) u. Z. f. Biol. **92**, 317, (1932) - 4 Hahn, A., Belmonte u. Niemer, Z. f. Biol., **91**, 491, (1931) - Hahn, Fischbach u. Niemer, Z. f. Biol., **92**, 535, (1932) - 5 Lehmann, Einf. chem. Physiologie, VII. Aufl., Berlin u. Heidelberg, Springer, **1947**, 350

Zur Überführung von Acetessigsäure in β -Oxybuttersäure durch Hefe

Von Herta Duttenhöfer *)

Mit 7 Tabellen

Eingegangen am 8. März 1944

Die Reduktion von Acetessigsäure zu Oxybuttersäure durch Hefe ist von *Friedmann* in mehreren Arbeiten¹ untersucht worden. Gegen die Bedingungen, unter denen er seine Versuche angestellt hat, lassen sich manche Einwände erheben. Deshalb wird im folgenden über eigene Versuche berichtet, die unter angemessenen Bedingungen das Studium der phytochemischen Reduktion der Acetessigsäure zum Gegenstand hatten.

Die *Friedmannschen* Befunde sind u. a. wegen der langen Versuchsdauer (16—48 Std. bei 21 °) und der damit verbundenen möglichen Infektion mit Mikroorganismen nicht beweisend. Er setzte zwar zu den Gärungsansätzen Toluol, stellte aber fest, daß Zusatz von 1% Toluol das Wachstum von milchsäurebildenden Bakterien nicht aufhebt. Durch den Zusatz von Toluol wird aber, worauf *Friedmann* gar nicht eingeht, die Gärfähigkeit der Hefe schwer geschädigt.

Die *Friedmannschen* Versuche wurden in Flaschen angesetzt, die mit Watte verschlossen waren. Sie fanden also nicht unter streng anaëroben Bedingungen statt, wenn auch bei guter Gärung die Luft wohl ziemlich vollkommen durch die entwickelte Kohlensäure verdrängt worden ist.

Vor allem hatte *Friedmann* in seinen Ansätzen keine genügend festgelegte Wasserstoffzahl. So erklärt es sich, daß der Autor zu dem merkwürdigen Resultat kommt, das Maximum des Abbaus der Acetessigsäure durch Hefe finde bei einer Wasserstoffzahl von 10^{-1} (entsprechend einer $n/10$ HCl!) statt. An anderer Stelle gibt der Autor an, die Messung der Wasserstoffzahl habe ergeben, daß bei Vermischung der von ihm verwandten Pufferlösung von $[H\cdot] = 10^{-2}$ mit der entsprechenden Menge Hefe eine Lösung mit der Wasserstoffzahl von $10^{-4,59}$ entstanden sei, die während der Gärung die Wasserstoffzahl von 10^{-4} bekommen habe. Damit verlieren die

* Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich bestens für die Gewährung eines Forschungsstipendiums.

von *Friedmann* in den Tabellen angegebenen Werte für die Wasserstoffzahl seiner Versuchsansätze, die die Wasserstoffzahl des *verwendeten Puffers* angeben, jede Bedeutung.

Auch die Methoden zur Bestimmung der Oxybuttersäure, die *Friedmann* benutzt, sind wenig befriedigend. In den meisten Versuchen stellt er die Menge der entstandenen Säure durch Bestimmung der optischen Drehung von Hefeextrakten fest. Abgesehen davon, daß diese Methode ganz unspezifisch ist, sind die beobachteten Drehungen sehr gering und die durch Umrechnung erhaltenen Werte mit großen Fehlern behaftet. Auch versagt die Methode in manchen Fällen, wie *Friedmann* selbst angibt, weil der entstandenen Oxysäure manchmal deren optischer Antipode beigemischt sein soll. Die später von *Friedmann* benutzte Methode der Oxydation der Oxybuttersäure mit Dichromat ist unbrauchbar, worüber bei der Bestimmung der Oxybuttersäure das Nähere zu finden ist.

Ich stellte die Versuche so an, daß die Hefe in Acetatpuffer von $[H \cdot] = 10^{-5,2}$ suspendiert wurde, entsprechend dem Optimum der Wasserstoffzahl² für die Hefegärung, wodurch die Gewähr gegeben ist, daß die Hefe unter optimalen biologischen Bedingungen arbeitet. Die Gärung vollzog sich im *Vakuum* unter Absorption der entstandenen Kohlensäure durch Barytlauge. Die Versuchsdauer betrug im allgemeinen nur wenige Stunden (3—4 Std. bei 30 Grad), wobei die Mitwirkung von Mikroorganismen kaum in Rechnung zu ziehen ist. Der Zusatz eines Desinfektionsmittels, wie Toluol, das stets auch die Lebenstätigkeit der Hefe stark beeinträchtigt, unterblieb. In einzelnen Fällen, um besonders große Ausbeuten zu erhalten, wurden auch länger dauernde Versuche aufgearbeitet. Als Hefe kam ganz frische Bäckerhefe der Münchner Bäckerinnung zur Verwendung, von verschiedenen Fabriken hergestellt. Der frische Zustand der Hefe schließt einen stärkeren Gehalt an fremden Mikroorganismen aus, was auch die mikroskopische Untersuchung ergab.

I. Methodik

1. Herstellung der Lösung von Acetessigsäure

Die Herstellung der Lösung von *acetessigsaurem Natrium* erfolgte durch Spaltung des Äthylesters nach *Ljunggren*³. Zu 2000 ccm n/10 NaOH kamen 26,2 ccm Acetessigester. Die Lösung blieb 8 Stunden bei 25—30° stehen. Danach ist die Spaltung vollständig, wovon wir uns durch Titration überzeugten. Der geringe Überschuß an Natronlauge wird mit Salzsäure neutralisiert und die Lösung zum Versuch verwendet.

2. Herstellung der Lösung von Oxybuttersäure

Die Lösungen von Oxybuttersäure dienen zur Ausarbeitung einer Bestimmungsmethode dieser Säure. Sie werden aus Krotonsäure nach *Büllmann*⁴ hergestellt. Da die so erhaltenen Lösungen frei von Kroton- und Schwefelsäure sind, kann in ihnen der Gehalt an Oxybuttersäure durch einfache Titration mit Alkali unter Benutzung von Phenolphthaleïn als Indikator bestimmt werden.

3. Herstellung der PufferstammLösung

Zu 1,6 ccm Eisessig und 13,6 g Natriumacetat wurden 300 ccm Wasser gefügt. Die Wasserstoffzahl dieser Lösung beträgt 10—5,3, die Konzentration an Acetat ist $\frac{2}{3}$ m.

4. Zusammensetzung und Aufarbeitung der Gärungsansätze

Die Gärungsansätze wurden nach Abschluß der Versuche mit *kolloidalem Eisenhydroxyd*⁵ entweißt, der noch vorhandene Traubenzucker durch *Kupfer-Kalkfällung* entfernt. Im Folgenden soll die Zusammensetzung und die Aufarbeitung eines typischen Ansatzes mit Hefe beschrieben werden.

40 g Bäckerhefe wurden in 200 ccm Acetessigsäurelösung (1%) und 20 ccm Acetatpufferlösung gut zerkleinert und durch Umrühren ein homogener Brei hergestellt. Dann wurden 10–40 g Glukose (reinst, Merck) zugegeben und durch Umrühren in Lösung gebracht. Das Gärgefäß wird durch ein Glasrohr, das einen Tropfenfänger besitzt, mit einer Saugflasche verbunden, die mit 500 ccm einer gesättigten Barytlösung beschickt war. Die ganze, durch Gummischläuche und Klemmen in entsprechender Weise verschlossene Anordnung wurde, nachdem sie evakuiert war, unter das Wasser eines großen Thermostaten von 30° versenkt. Die Gärung vollzog sich so unter anaeroben Bedingungen; die entwickelte Kohlensäure wurde von der Barytlauge absorbiert, ein Prozeß, der durch öfteres Umschütteln beschleunigt wurde. Bei sehr starker Gärung wurde die Barytlauge in der Saugflasche mehrmals erneuert, was durch Abklemmen der Verbindung zwischen Gärgefäß und Vorlage und erneutes Evakuieren der frisch gefüllten Saugflasche leicht unter Erhaltung des Vakuums im Gärgefäß zu bewerkstelligen ist.

Nach Abschluß des Versuches wurde mit *kolloidalem Eisenhydroxyd* (Liq. Ferri oxydati dialysati 10%; Merck) enteiweißt. Aus einer Bürette läßt man die Eisenlösung *tropfenweise* zulaufen, während man den hefehaltigen Ansatz stark schüttelt. Die Enteiweißung ist bei 40 g Hefe vollständig, sobald 25 ccm Eisenlösung zugesetzt sind. Nach Filtration, die sofort vorgenommen werden kann, erhält man ein leicht gelblich gefärbtes *eiweiß-* und *eisenfreies* Filtrat.

Wenn die gebildete Oxybuttersäure bestimmt werden sollte, wurden auf je 200 ccm Filtrat 2 ccm konzentrierte Schwefelsäure zugesetzt. Die saure Lösung wurde 10 Minuten schwach am Sieden erhalten, wodurch die noch vorhandene Acetessigsäure entfernt wird, die bei der später zu erwähnenden Bestimmung der Oxybuttersäure durch Destillation mit Schwefelsäure stört.

Die Entfernung des im Filtrat nach Abschluß der Gärung noch etwa vorhandenen Traubenzuckers erfolgte durch die *Kupfer-Kalkfällung*. Hierzu wurde das Filtrat durch Zugabe von Natronlauge gegen Phenolphthalein eben alkalisch gemacht und dann mit 20 ccm 10% Kupfersulfatlösung und 40 ccm Kalkmilch versetzt. (Zur Herstellung der letzteren gibt man in eine Porzellanschale 200 g Kalziumoxyd in Stücken und löscht unter Umrühren den Kalk mit Wasser. Der gelöschte Kalk wird unter Zugabe von Wasser durch Schütteln in Kalkmilch verwandelt. Im ganzen verwendet man 1 Liter Wasser.) Vom Niederschlag dieser ersten Kupfer-Kalkfällung wurde erst nach Stehen über Nacht abfiltriert. Das Filtrat wurde noch durch 2 weitere Kupfer-Kalkfällungen mit 15 ccm Kupfersulfat + 30 ccm Kalkmilch beim ersten Mal und 10 ccm Kupfersulfat + 20 ccm Kalkmilch beim zweiten Mal entzuckert, wobei die Niederschläge aber schon nach halbstündigem Stehen abfiltriert wurden. In den meisten Fällen, bei gut gärender Hefe, ist die Lösung schon nach 2 Kupfer-Kalkfällungen zuckerfrei. Bei allen Versuchen, die zur Bestimmung der Oxybuttersäure dienten, wurden aber stets, auch wo es nicht nötig gewesen wäre, 3 derartige Fällungen gemacht, um genau vergleichbare Verhältnisse zu haben.

5. Die Bestimmung von Acetessigsäure und Oxybuttersäure

Die Bestimmung der *Acetessigsäure* läßt sich in wässriger Lösung der reinen Säure oder ihres Alkalisalzes bis zu sehr geringen Konzentrationen ganz exakt nach *van Slyke*⁶ durchführen. Die Methode beruht auf

der Ausfällung des aus der Acetessigsäure durch Kochen mit Schwefelsäure gebildeten Acetons mit HgSO_4 als Komplexsalz. Der Niederschlag muß nach Beendigung der Reaktion sofort auf einem Jenaer Glastiegel (1 G 4) abgesaugt und mit kaltem Wasser nachgewaschen werden. Nach 4—5 stdg. Trocknen bei 110° kann man den Niederschlag wägen. Ich fand in Lösungen des reinen Alkalisalzes den theoretischen Wert innerhalb der Konzentration von 0,1 bis 0,01 %, wobei in dem bestimmten Anteil 60 bis 10 mg Acetessigsäure vorhanden waren.

Ist Glukose gleichzeitig in Lösung vorhanden, so versagt die Methode vollkommen; die Werte werden viel zu hoch. Hieraus folgt, daß der Zucker durch die Kupfer-Kalkfällung entfernt werden muß. Da alle Bestimmungen in stark gärenden, also zum Schluß sehr zuckerarmen Ansätzen gemacht

Tabelle 1
Bestimmung der Acetessigsäure in Ansätzen mit Hefe und Glukose

Gefunden (mg.)	274	281	284	179	119	121	178
Zugesetzte Menge (mg.)	288	288	288	173	115	115	173
Davon gefunden %	95	98	99	103	103	105	103

wurden, erfolgte die Prüfung der Methode in Lösungen, die neben Hefe und Puffer in der früher für Ansätze angegebenen Menge 0,5 % Glukose enthielten. Es wurde nur eine Kupfer-Kalkfällung gemacht, der Niederschlag schon nach $\frac{1}{2}$ Stunde abfiltriert und im Filtrat die Bestimmung vorgenommen. Die Resultate solcher Versuche gibt Tabelle 1 wieder. Man findet unter solchen Bedingungen bei einer Konzentration von 0,7 bis 0,3 % die Acetessigsäure quantitativ. Ob vor der Kupfer-Kalkfällung enteiweißt wird oder nicht, spielt für das gefundene Resultat keine Rolle, wovon ich mich durch besondere Versuche überzeugte. *Man kann somit bei Gärungsansätzen die Hefezellen abfiltrieren, im erhaltenen Filtrat die Kupfer-Kalkfällung vornehmen und in deren Filtrat die Bestimmung der Acetessigsäure ausführen.*

Sehr schwierig und — wie gleich vorweggenommen sei — nicht in befriedigender Weise lösbar, ist die Bestimmung der *Oxybuttersäure*.

Die von *Friedmann* benutzte Methode, die optische Drehung von Hefextrakten zu bestimmen, ist, wie in der Einleitung schon ausgeführt wurde, kaum brauchbar. Ganz unbrauchbar ist für unsere Zwecke die Methode von *van Slyke*⁷ und überhaupt jede Methode, bei der zunächst die Oxybuttersäure durch Oxydation mit Dichromat in Acetessigsäure übergeführt wird. Hefe, die im Vakuum digeriert wird, bildet reichliche Mengen von Milchsäure, die bei der Oxydation mit Dichromat durch Bildung von Acetaldehyd einen Scheinwert von Oxybuttersäure ergibt. Auch die Modifikation der Oxydationsmethode nach *Snapper* und *Grünbaum*⁸ gibt trotz ihrer großen Umständlichkeit nur um 70 % des theoretischen Wertes. Aus dem gleichen

Grunde ist auch die Methode von *Eichler* und *Hindemith*⁹, die übrigens, wie die Autoren selbst angeben, nicht besonders befriedigend ist, für unsere Untersuchungen nicht verwendbar. Es muß festgestellt werden, daß es z. Z. keine brauchbare Methode gibt, um bei Versuchen mit lebendem Material Oxybuttersäure exakt zu bestimmen.

Ich ging daher zur angenäherten Bestimmung der Oxybuttersäure auf die alte Methode von *Pribram*¹⁰ zurück, die darauf beruht, daß man die Oxybuttersäure durch Erhitzen mit hochkonzentrierter Schwefelsäure in Krotonsäure überführt und diese im Destillat durch ihre Fähigkeit, Brom zu addieren, bestimmt. Die Methode hat den Vorteil, ziemlich spezifisch zu sein. In den wenigen Beispielen, die *Pribram* für seine Methode in wäss-

Tabelle 2
Bestimmung der Oxybuttersäure in wässriger Lösung

Gefunden (mg.)	168	170	163	160	173	165	/	90	90
% der zugesetzten Menge	87	89	85	84	90	86	/	81	81
Dauer der Destillation (h)	1½	2	1¼	2	1½	2½	/	1¼	2
Substanz	Freie Säure (192 mg.)							Natriumsalz (= 110 mg. Säure)	

riger Lösung gibt, findet er praktisch den theoretischen Wert der Oxybuttersäure. Bei einer Nachprüfung der Methode in unserem Institut durch *Haertle*¹¹ konnten nur 86 % bis 92 % der zugesetzten Oxybuttersäure in wässriger Lösung gefunden werden. Zum gleichen Resultat kam ich auch jetzt wieder, bei der Destillation reiner Lösungen der Oxybuttersäure (Tab. 2).

Die Methode war die folgende: ich destillierte die Lösung der Oxybuttersäure nach Zusatz von soviel Schwefelsäure, daß deren Konzentration 60 Gew. % war. Als Destillationskolben wurde das Destillationsgefäß, das *Parnas*¹² bei seiner Mikro-Kjeldahl-Apparatur angegeben hat, verwendet. Das bei dieser Methode zur Einleitung von Wasserdampf dienende Rohr wurde durch einen Gummischlauch mit Glasstab verschlossen. Die in diesem Rohr nach Füllung des Kolbens eingeschlossene Luft bewirkt während der ganzen Destillation ein ruhiges Sieden. An den Destillationskolben wurde ein gewöhnlicher Liebigkühler mit Vorlage angeschlossen. Die Erhitzung des Destillationskolbens erfolgte in einem Babotrichter. Der aus diesem Trichter herausragende Teil des Destillationsgefäßes war mit aufgeklebtem Asbestpapier gegen Wärmeabgabe geschützt. Durch einen Trichter wurde die abdestillierende Flüssigkeit durch Zutropfen der gleichen Menge von Wasser wieder ersetzt. Die Gesamtflüssigkeitsmenge im Destillationskolben betrug bei meinen Versuchen stets 54 cm. Die durchschnittliche Dauer der Destillation war 1½—2 Std., doch kann sie auch gelegentlich 3 Std. betragen. Die Beendigung der Destillation wurde dadurch festgestellt, daß einige Tropfen Destillat, mit Soda versetzt, keine Entfärbung von Permanganat

hervorrufen (Baeyersche Probe). Im allgemeinen geht die Destillation ruhig vonstatten. Doch kommt es hie und da vor, allerdings nicht bei Bestimmung der Oxybuttersäure in wässriger Lösung, sondern nur in Gäransätzen, daß starkes Schäumen auftritt. Eine solche Destillation kann nicht zu Ende geführt werden, sondern muß verworfen werden.

Im Destillat wurde die Krotonsäure durch ihr Bromadditionsvermögen bestimmt. Zum Destillat kommt ein Überschuß von Bromwasser. Nach ca. 5 Minuten langem Stehenlassen in einer Flasche mit eingeschliffenem Stopfen wurde festes Jodkalium zugefügt und das in Freiheit gesetzte Jod durch Titration mit $\frac{n}{10}$ Thiosulfatlösung bestimmt. Da das Bromwasser keine bestimmt festgelegte Zusammensetzung hatte, wurde in einem Kontrollversuch stets die gleiche Menge Bromwasser zu einer der Menge des Destillats gleichen Quantität Wasser zugesetzt, und eine analoge Bestimmung durchgeführt. Die Differenz des Thiosulfatverbrauchs im Null- und Hauptversuch entspricht der an die Krotonsäure addierten Brommenge und damit der vorhandenen Oxybuttersäure.

Die in wässriger Lösung gefundene Menge Oxybuttersäure betrug, ebenso wie in den Versuchen von *Haertle* im Mittel 88 %. Den theoretischen Wert der Oxybuttersäure stellten wir durch direkte Titration der aus Krotonsäure hergestellten Lösung von Oxybuttersäure fest. Die Berechtigung hierzu ergab sich aus Bestimmungen, die mit dem Natriumsalz der Oxybuttersäure (chem. rein; Schuchardt) vorgenommen wurde. Wir fanden hier 81 % der berechneten Menge, ein Wert, der mit dem aus den Lösungen der freien Säure genügend übereinstimmt (Tab. 2).

Tabelle 3

Bestimmung der Oxybuttersäure in Ansätzen mit Hefe und Glukose

Gefunden (mg.)	139	150	146	173	144	134	162
% der zugesetzten Menge	73	78	76	90	75	70	84
Ansatz	1% Glukose				1% Glukose u. 5% Hefe		

Beim Fehlen einer exakten Methode zur quantitativen Bestimmung der Oxybuttersäure mußten wir uns mit der angegebenen Schätzung der Säure begnügen.

Ich stellte auch Bestimmungen an in Lösungen von Oxybuttersäure, die Glukose enthielten (Tab. 3). Wie bei der Aufarbeitung der Ansätze eingangs beschrieben worden ist, nahm ich zur Entfernung des Zuckers hintereinander drei Kupfer-Kalkfällungen vor. Die gefundene Menge ist hier, offenbar bedingt durch Verluste infolge von Adsorption bei der Fällung, etwas geringer (im Mittel 75 %). Sind außerdem noch 5 % Hefe zugegen und wird mit kolloidalem Eisenhydroxyd enteiweißt, so bleibt die gefundene Menge etwa die gleiche. Wir können also bei den Ansätzen mit gärender Hefe, in denen sich aus Acetessigsäure Oxybuttersäure gebildet hat, bei der Bestimmung etwa um 80 % der wirklich vorhandenen Säure erwarten.

II. Versuchsergebnisse

Um den Nachweis zu erbringen, daß bei der Digestion von Acetessigsäure mit gärender Hefe tatsächlich Oxybuttersäure entsteht, die bei Destillation in Krotonsäure übergeht, wurde letztere isoliert.

Drei Ansätze von der Zusammensetzung

40 g frische Bäckerhefe

40 g Glukose

20 ccm Acetatpuffer

200 ccm 1%ige Lösung von Acetessigsäure

wurden in der eingangs angegebenen Weise bei 30° im Vakuum 24 Std. vergoren. Dann erfolgte Enteiweißung durch kolloidales Eisenhydroxyd, Entfernung der Glukose durch dreimalige Kupfer-Kalkfällung und Destillation mit Schwefelsäure, wie zur Bestimmung der Oxybuttersäure. Die vereinigten Destillate wurden mit 30%iger Natronlauge neutralisiert und auf dem Wasserbad zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde nach *Friedmann* mit Phosphorsäure (1 Teil Phosphorsäure D = 1,7; 2 Teile Wasser) aufgenommen und mit frisch geglühtem Natriumsulfat verrieben. Nach Stehen über Nacht im Exsiccator war das Wasser vollkommen gebunden. Das Pulver wurde mit wasserfreiem Äther 10 Std. im Extraktionsapparat ausgezogen. Nach dem Abdampfen des Äthers kristallisierte die Krotonsäure aus, die nach Umkristallisieren aus Benzin (Sdp. 70—80°) den Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt mit reiner Krotonsäure von 72° ergab.

Tab. 4 enthält in der Mehrzahl *kurzdauernde* Versuche (3—4 Std.), bei denen die gebildete Oxybuttersäure bestimmt wurde. Hervorzuheben ist Versuch 15, in dem bei 4½ stdg. Gärung bei Gegenwart von 20% Glukose 432 mg Oxybuttersäure entstanden sind. Die Tabelle enthält auch einige Versuche von wesentlich längerer Gärungsdauer.

Tabelle 4

Bestimmung der bei der Hefegärung aus Acetessigsäure entstandenen Oxybuttersäure

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Konzentration der Glukose %	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	15	15	20	20	20	20
Dauer der Gärung (h)	3	4	3¼	3	3	4	3½	3	3	7½	27	29	6	7	4½	7
Gefundene Oxybuttersäure (mg.)	134	121	163	66	182	91	64	196	155	180	402	388	620	568	432	700

*Friedmann*¹³ gibt an, er habe auch in Ansätzen *ohne* Glukose, d. h. ohne gleichzeitige Vergärung von Zucker, die Bildung von Oxybuttersäure beobachtet. Die Versuchsdauer betrug hierbei 16 bis 48 Std., wobei allerdings die Mitwirkung fremder Mikroorganismen nicht auszuschließen ist. Auch war die Oxybuttersäure nach der Oxydationsmethode mit Kaliumdichromat bestimmt, die bei Gegenwart von Milchsäure nur ungenaue Resultate ergibt. Es erscheint schon aus diesem Grunde sehr fraglich, ob eine Bildung von Oxybuttersäure aus Acetessigsäure ohne gleichzeitige Gärung erfolgt ist.

Wir konnten niemals mit Sicherheit, auch nicht in längerdauernden Versuchen, die Reduktion von Acetessigsäure zu Oxybuttersäure ohne gleichzeitige Zuckervergärung beobachten.

Tab. 5 (1—7) enthält Versuche, die ebenso wie die Gärungsansätze zusammengesetzt waren, bei denen aber die Glukose weggelassen worden war. Die bei der Destillation gefundenen Mengen brombindender Substanz sind

Tabelle 5
Bestimmung der Oxybuttersäure in Ansätzen ohne Glukose
bezw. ohne Acetessigsäure

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Dauer des Versuches (h)	3½	3	3	2½	24	22	4	3½	4	3	3½
Gefundene Oxybuttersäure (mg)	37	8	2	29	17	36	35	22	8	0	0
Ansatz	40 g Hefe, 20 ccm Acetatpuffer, 200 ccm Acetessigsäure-Lösung (1 ‰)							40 g Hefe, 20 ccm Acetatpuffer, 40 g Glukose, 200 ccm Wasser			

recht gering. In den Versuchen 2 und 3 ist sicher überhaupt keine Oxybuttersäure entstanden. Die in den Versuchen 1, 4 und 7 gefundenen Werte brombindender Substanz sind sehr klein, wenn man die Zahlen nach Umrechnung auf Oxybuttersäure mit den entsprechenden Werten der Tabelle 4 vergleicht. Den Schluß zu ziehen, daß sie auf gebildete Oxybuttersäure zurückzuführen seien, ist nicht erlaubt. Bemerkenswert ist, daß auch bei langdauernden Versuchen (5 und 6) keine größeren Werte gefunden wurden, was bei einer Bildung von Oxybuttersäure wohl der Fall hätte sein müssen.

Die rechte Seite der Tab. 5 enthält Versuche, bei denen Glukose vorhanden, aber Acetessigsäure weggelassen worden war. In zwei Fällen (Versuch 8 und 9) wurde auch hier brombildende Substanz gefunden, die nach Umrechnung der angegebenen Menge Oxybuttersäure entspricht. Sie fallen durchaus in die Größenordnung der Mengen bei den Versuchen 1—7, woraus auch zu schließen ist, daß in letzteren keine Oxybuttersäure gebildet wurde; denn die Bildung dieser Säure ohne Zusatz von Acetessigsäure ist auszuschließen.

Tabelle 6

Vergleich der gebildeten Oxybuttersäure mit der verschwundenen Acetessigsäure

Konzentration der Glukose (‰) . . .	5	5	5	5	5	5	5	5	5	20	20
Dauer des Versuches (h) . .	3½	3½	3½	3	4	3	3	4	7	7	7
Gefundene Oxybuttersäure (mg) .	154	165	164	159	140	196	271	268	541	776	
Verschwundene Acetessigsäure (mg) . .	199	243	158	318	177	251	387	269	505	830	
Davon als Oxybuttersäure gefunden (‰) . .	78	68	104	50	79	78	70	100	107	94	

Tab. 6 enthält für eine Reihe von meist kurz dauernden Versuchen den quantitativen Vergleich der gebildeten Oxybuttersäure mit der verschwundenen Acetessigsäure.

Bei der Aufstellung der Tabelle 6 war zu berücksichtigen, daß zwar die Acetessigsäure quantitativ bestimmt werden kann, daß aber die gebildete Menge von Oxybuttersäure nur der Größenordnung nach geschätzt wird. Ich nehme nach dem Vorhergehenden an, daß die Zahlen für die gefundene Oxybuttersäure im Durchschnitt 80 % der wirklich gebildeten sind. Durch Umrechnung der für Oxybuttersäure gefundenen Werte von 80 % auf 100 % und Vergleich mit den Werten der 4. Querreihe sind die Zahlen der letzten Reihe erhalten worden. Man sieht, daß 50 % bis 107 % der im Versuch verschwundenen Acetessigsäure als Oxybuttersäure gefunden worden sind. Es bedarf wohl keiner Erwähnung, daß die Überschreitung des Wertes von 100 % eine Folge der größenordnungsmäßigen Abschätzbarkeit der Werte für Oxybuttersäure ist.

Es ergibt sich aus diesen Versuchen, daß die Reduktion zu Oxybuttersäure die Hauptveränderung ist, die die Acetessigsäure durch gärende Hefe erleidet. Ob daneben in geringem Umfang noch eine andere Veränderung der Acetessigsäure vorkommt, läßt sich mit Hilfe der uns zu Verfügung stehenden Methode nicht feststellen.

Tabelle 7
Bestimmung der durch Ketonspaltung abgebauten Acetessigsäure

Hauptversuch Zur Titration der Barytvorlage ver- brauchte $n/10$ -H Cl (ccm)	Kontrollversuch Zur Titration der Barytvorlage ver- brauchte $n/10$ -H Cl (ccm)	Im Hauptversuch gegenüber dem Kontrollversuch mehr gebildetes CO_2 (mg)	Anteil (0/0) der zu- gesetzten Acetessig- säure, der unter CO_2 -Abspaltung abgebaut wurde
14.80	30.8	35.0	3.9
7.01	34.24	59.9	6.9
18.79	27.55	19.3	2.2
15.30	35.14	43.6	5.0

Die Abspaltung von CO_2 unter Entstehung von Aceton spielt als Abbauvorgang der Acetessigsäure nur eine ganz untergeordnete Rolle.

Dies wurde folgendermaßen festgestellt: In Versuchen von der Zusammen-

setzung

40 g Hefe

20 ccm Acetatpuffer

200 ccm 1%ige Lösung von Acetessigsäure

die 4 Std. bei 30° im Vakuum unter Vorlage von 50 ccm Barytlauge digeriert wurden, wurde die gebildete Kohlensäure durch Titration der Barytlösung mit $n/10$ HCl festgestellt. Damit verglich ich jeweils die gebildete Kohlensäuremenge in einem Kontrollversuch, der statt Acetessigsäurelösung 200 ccm Wasser enthielt. (Tab. 7) Man erkennt, daß die durch Ketonspaltung abgebaute Menge Acetessigsäure höchstens 2,2 % bis 6,9 %, der im Versuch vorhandenen Acetessigsäure beträgt, vorausgesetzt, daß die gebildete CO_2 -Menge überhaupt der Ketonspaltung der Acetessigsäure und nicht irgendeinem anderen Abbauweg, bei dem Kohlensäure entsteht, entstammt.

Es wurde auch versucht, die Bildung von Oxybuttersäure aus Acetessigsäure in Fermentlösungen, d. h. abgetrennt von der Zelle, vor sich gehen

zu lassen. Hierzu stellten wir zuerst Säfte her, die einen Teil der Hefefermente enthalten und die von Willstätter¹⁴ zur Bestimmung des Maltosegehaltes der Hefe benutzt worden waren. Solche Säfte vergären Zucker nicht. Eine Reduktion von Acetessigsäure zu Oxybuttersäure findet auch bei Gegenwart von Glukose nicht statt, wie unsere Versuche ergeben haben.

Weiterhin wurde aus Trockenhefe nach Lebedew¹⁵ ein Hefesaft hergestellt. Dieser Saft zeigt aber nach einer langen Inkubationszeit eine deutliche Gärung erst dann, wenn er durch wachsende Bakterien deutlich getrübt ist. Unter diesen Bedingungen fand auch deutlich Reduktion von Acetessigsäure zu Oxybuttersäure statt, jedoch kann in diesem Fall *nicht* geschlossen werden, daß dieser Vorgang durch Fermente des Hefesaftes sich vollzogen hat. Viel näher liegend ist die Annahme, daß die Bakterien, die die Zuckergärung verursacht haben, auch die Reduktion der Acetessigsäure hervorriefen.

Zusammenfassung

Es wird gezeigt, daß gärende Hefe Acetessigsäure zu β -Oxybuttersäure hydriert.

Herrn Professor Dr. A. Hahn bin ich für die Anregung zu dieser Arbeit und zahlreiche Ratschläge bei ihrer Ausführung zu großem Dank verpflichtet.

Literatur

- 1 Friedmann E., Biochem. Z. **243**, 123, (1931); **244**, 42, 57, 69, (1932) — 2 Oppenheimer, Lehrbuch der Enzyme, Leipzig, Georg Thieme, 1927, 561; Abderhalden, Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden: C. Neuberg, Abfangverfahren, Berlin, Urban & Schwarzenberg, 605 — 3 Ljunggren G., Biochem. Z., **145**, 425, (1924) — 4 Büllmann E., B., **1910** I, 579 — 5 Rona P., Biochem. Z. **27**, 348, (1910) — 6 van Slyke D., J. biol. Chem., **32**, 455 — 7 van Slyke D., loc. cit. — 8 Snapper J. u. A. Gruenbaum, Biochem. Z., **175**, 357, (1926) — 9 Eichler O. u. H. Hindemith, Biochem. Z., **314**, 73, (1943) — 10 Pribram O., Z. f. exp. Path. u. Ther., **10**, 279, (1911/12) — 11 Haertle H., München, Diss. 1934; 12 Parnas J. K., Zanal. Chemie, **114**, 261 (1938) — 13 Friedmann E., Biochem. Z., **244**, 60 (1932) — 14 Willstaetter R. u. W. Steibelt H. S., **111**, 157 (1920) — 15 Lebedew J., H. S., **73**, 447 (1911)

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin der Universität München

(Vorstand: Professor Dr. W. Laves)

Ribonukleinsäuren in den weißen Formelementen des Blutes und des Knochenmarkes

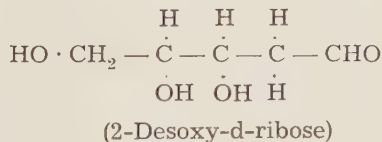
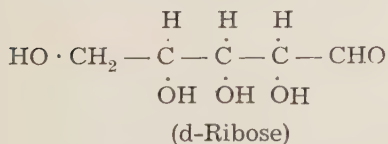
Von Karl Thoma

Mit 6 Abbildungen

Eingegangen am 26. Mai 1949

Unter den verschiedenen Bausteinen der Zelle beanspruchen in neuerer Zeit die zusammengesetzten Eiweißkörper, die Nukleoproteide besonderes Interesse. Sie finden sich in den Kernen, im Zellplasma und den meisten Sekreten des tierischen Organismus und sind an den zentralen Lebensvorgängen der Fortpflanzung, der Vererbung und des Wachstums wesentlich beteiligt. Infolgedessen haben die Nukleinstoffe seit langem auch in medizinischer Hinsicht Forschungen angeregt, die einerseits die Aufklärung ihrer chemischen Konstitution und andererseits ihrer Lokalisation im Zellverband zum Ziele haben. Obwohl aber die Entdeckung der Nukleoproteide durch *Fr. Miescher* auf die Jahre 1869 bis 71 zurückgeht, harren auch heute noch viele, diese Stoffgruppe betreffende Probleme der Lösung.

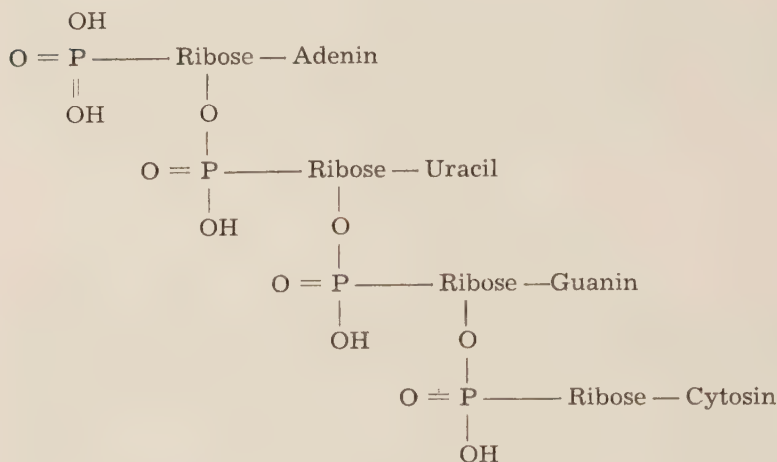
Die beiden Nukleoproteidkomponenten setzen sich aus den Nukleinsäuren, als prosthetischer Gruppe, und einem Eiweißanteil zusammen. Die Nukleinsäuren, die im weiteren hauptsächlich Erwähnung finden, teilen sich in die beiden großen Gruppen der Ribo- oder Hefenukleinsäuren (RNS) und der Thymo- oder Desoxyribonukleinsäuren (DNS). Durch die Arbeiten von *Kossel* und *Levene* sind als Spaltprodukte beider Nukleinsäuren, o-Phosphorsäure, Purin- und Pyrimidinbasen, sowie als Kohlehydrate Pentosen bekannt. Ribonukleinsäuren enthalten die d-Ribose, Thymonukleinsäuren dagegen die d-2-Ribodesose oder Thyminose. Beide Zuckerkomponenten sind nach *Levene* und *Tipson* Furanosen:



Die Nukleinsäuretypen unterscheiden sich ferner hinsichtlich ihrer Basen, worauf aber in diesem Rahmen nicht näher eingegangen werden kann. Der saure Charakter der Nukleoproteide läßt sie mit basischen Farbstoffen

unlösliche Salze bilden, die Grundlage der meisten histologischen Verfahren der Kernfärbung.

Durch Extraktion mit alkalischen Lösungen lassen sich aus den ursprünglich hochpolymeren Nukleinsäuren Tetranukleotidkomplexe gewinnen, welche sich durch eine bemerkenswerte Stabilität auszeichnen. Diesen liegt offenbar die von *Steudel* und *Levene* aufgestellte, später von *Thannhauser* und *Klein*, *F. G. Fischer* u. a. modifizierte Struktur zugrunde.



(Schematischer Bau des Tetranukleotids aus Hefenukleinsäure)

Man kann sich somit von der Struktur der Nukleinsäuren die Vorstellung langer Kettenmoleküle machen, in welchen die Tetranukleotide, anscheinend unverzweigt, durch esterartige Bindung zwischen dem Zucker des einen und der Phosphorsäure des nächsten Tetranukleotids zu den Polynukleotiden aneinandergereiht sind.

Was die Methoden zur *histochemischen Identifizierung* der beiden Typen von Nukleinsäuren betrifft, so ist die von *Feulgen* und *Rossenbeck* ausgearbeitete Nuklealreaktion ohne Zweifel die wichtigste. Es handelt sich um eine echte Aldehydreaktion, die an den nach der Hydrolyse verbleibenden Rest der DNS — von *Kossel* als Thyminsäure bezeichnet — gebunden ist. In Ausstrichen, die mit nHCl bei 60° kurz erwärmt und anschließend mit entfärbter fuchsin-schweflicher Säure behandelt werden, tritt Rotfärbung der DNS auf. RNS ist dagegen Feulgen negativ. Wurde somit der eindeutige Nachweis von DNS mit Hilfe der Feulgen-Reaktion in Zellkernen erbracht, so war es in der Folgezeit *Caspersson*, der durch die Ultraviolett-spektroskopie zum ersten Male auch im Cytoplasma exakt Nukleinsäuren zu lokalisieren vermochte. Allerdings gestattet diese Methode nicht die einzelnen Nukleinsäuren zu unterscheiden, da die Absorptionsbanden für DNS und RNS fast vollständig miteinander übereinstimmen. Von amerikanischen Autoren wurde ein kolorimetrisches Verfahren zur Bestimmung von DNS und RNS erfolgreich entwickelt, außerdem stammt von *Hahn* eine Methode, die sich auf die *Tollensche* Farbenreaktion stützt.

Einen für RNS spezifischen Test fand *Brachet* bei histoenzymatischen Versuchen an Plasmasubstanzen. *Brachet* bediente sich der Ribonuklease aus Rinderpankreas, die weder DNS noch Proteine oder Glykoproteide angreift. Es soll auch nicht unerwähnt bleiben, daß *van Herwerden* bereits 1913/14 Versuche in dieser Richtung mit einem aus Milz hergestellten Fermentextrakt unternommen hat.

Nachdem es seit *Miescher* und *Kossel* bekannt war, daß das Chromatin als identisch mit den nukleinhaltigen Substanzen angesehen werden kann, erbrachte *Feulgen* den eindeutigen histochemischen Nachweis, daß das Vorkommen der DNS auf die Chromosomen bzw. Zellkerne beschränkt ist. *Brachet* zeigte, daß die chromophilen, stark basischen Substanzen des Cytoplasmas der Nißschollen, des Ergastoplasmas im Pankreas und der verhornenden Epidermis auf RNS beruhen, während amerikanische und schwedische Autoren (*v. Euler*, *Hahn*) wechselnde Konzentrationen von RNS und DNS in den verschiedenen Geweben feststellten. Demnach sind Pankreas, Schleimhaut und wachsende Gewebe sehr reich an Ribonukleotiden, während die DNS in Milz und Thymus überwiegen.

Soweit mir nun die Literatur zugänglich war, liegen über das Verhalten von RNS und DNS in Blutzellen sowohl bezüglich ihrer Konzentration als auch ihrer Lokalisation keine Untersuchungen vor *). Dabei bilden gerade die Formelemente des Blutes für derartige Studien besonders geeignete Objekte. Handelt es sich doch um hochdifferenzierte Zellen, deren basophile Plasmasubstanzen den Gedanken an die Anwesenheit von Ribonukleotiden nahelegen. Weiterhin sprach der von verschiedenen Seiten bestätigte unterschiedliche Ausfall der *Feulgenschen* Reaktion in diesem Sinne. Die Erklärung hierfür wurde teils in Konzentrationsunterschieden der DNS gesucht, teils wurde angenommen, daß die Thyminsäure, manchmal fest im Zellverband fixiert, zuweilen aber leicht löslich ist (*Voit* und *Borgard*). Wenn auch ihre Konzentration ohne Zweifel differieren kann, so liegt für die Annahme, daß die Löslichkeit der Thyminsäure bei gleicher Behandlung der Präparate Schwankungen unterworfen sein soll, kein Beweis vor. Vielmehr ist zu bedenken, daß bei schwach ausfallender Nuklealreaktion neben der DNS noch andere Nukleinsäuren vom Typ der RNS im Zellkern enthalten sein können, die sich *Feulgen*-negativ verhalten.

Auf Anregung meines Chefs, Herrn Professor *Laves*, sollte das Vorkommen und die Verteilung von Ribonukleotiden in Kernen und Plasma der Blutzellen und ihrer Knochenmarksvorstufen mit Hilfe des *Brachet-Testes* einer eingehenden Untersuchung unterzogen werden.

Untersuchungsmethoden

Material: Für die Untersuchungen fanden Ausstriche von Normalblut, ferner solche von Patienten mit myeloischen und lymphatischen Leukämien, schließlich Sternalpunktate und Knochenmarksausstriche frischen Leichenmaterials Verwendung.

*) Während der Drucklegung dieser Arbeit wurden mir die Mitteilungen von *J. C. White*, *J. N. Davidson* und *I. Leslie* zugänglich, die sich vor allem mit der Verteilung der Nukleinsäuren im Plasma der Knochenmarkszellen beschäftigen.

a) Fixierung

Es wurden 2 verschiedene Fixierungsmittel verwendet, nämlich Äthanol und Methanol einerseits und

das Zinkacetat-Formalinalgemisch nach *Schiller* andererseits. Bekanntlich gibt es kein Verfahren, durch welches alle Zell- und Gewebsbestandteile gleich gut fixiert werden. Für die histoenzymatischen Untersuchungen war es aber von größter Wichtigkeit, Kern- und Plasmabestandteile nicht nur möglichst umfassend, sondern auch chemisch unverändert zu erhalten. In dieser Hinsicht erschien daher Äthanol und Methanol besonders geeignet, zumal die Färbung alkoholfixierter Präparate im allgemeinen gute Ergebnisse liefert. Die Wahl eines weiteren Fixierungsmittels ging von den Untersuchungen von *Schiller* aus, nach welchen Formolzusatz insbesondere eine ausgezeichnete Fixation saurer Proteine und Proteide ermöglicht. Dabei war allerdings zu berücksichtigen, daß durch den Einfluß der Formolfixation eine Methylenierung dieser Ampholyte mit Verschiebung immer i. P. nach der saueren Seite eintritt (*Spatz, Zeiger*). Es wird später darauf einzugehen sein, in welcher Weise die Formolfixierung den Ablauf der enzymatischen Hydrolyse beeinflußt. An sich war zu erwarten, daß der Abbau der Nukleoproteide nach Formolfixierung langsamer verlaufen würde, als nach Alkoholhärtung. Die Fixierungsdauer betrug 5 Min. für Methanol, 30 Min. für Äthanol bzw. das Schillersche Gemisch (100 ccm Formol 0,4 %ig 2,98 g Zinkacetat).

b) Färbungen

Es ist eine bekannte Tatsache, daß schon bei Färbung von Normalblutausstrichen mit Farbstoffgemischen mehr oder weniger große Unterschiede im Färbungsbild auftreten können. Das destillierte Wasser, die Art und Dauer der Fixierung, die Länge der Farbeinwirkung, das pH der Farblösungen, das Alter der Ausstriche, die Güte derselben und schließlich Differenzen in der Zusammensetzung des Farbstoffes selbst sind von ausschlaggebender Bedeutung für das gleichmäßige Gelingen der Färbung. Es ist einleuchtend, daß die Schwierigkeiten in der Beurteilung der resultierenden Zellbilder nach Behandlung von Präparaten mit Enzymlösungen noch vergrößert werden, so daß Schlüsse auf das Vorliegen enzymatisch bedingter Veränderungen nur mit Vorsicht gezogen werden dürfen. Um daher zu verwertbaren Ergebnissen zu gelangen, war es notwendig, eine möglichst große Anzahl von Ausstrichen anzufertigen, und sich unter Anwendung verschiedener Farblösungen und Fixierungsflüssigkeiten mit dem Normalbild vertraut zu machen. Das destillierte Wasser wurde durchwegs durch Puffergemische auf pH 7,0 eingestellt, im übrigen Normalausstriche und solche der betreffenden Versuchsreihe jeweils in genau der gleichen Weise behandelt.

Zur Färbung von Blutausstrichen stand eine Reihe gebräuchlicher Methoden zur Verfügung. Nach orientierenden Versuchen mit Triazid, May-Grünwald, Giemsa, Methylenblau, Kernechtrot, Kristallponceau, Eosin-Hämatoxylin, Eosin-Methylenblau, Methylgrün-Pyronin, erwiesen sich Färbungen mit einfachen Farbstoffen wie Methylenblau, Eosin und vor allem mit Methylgrün-Pyronin am geeignetsten. Wo es zweckmäßig erschien, wurden die einzelnen Färbungen zur Kontrolle der erzielten Bilder am gleichen Präparat kombiniert. Außerdem wurden gepufferte Methylenblaulösungen nach der Angabe von *Schwarz-Karsten, Mommsen* zur Bestimmung der isoelektrischen Punkte angewandt. Von größter Bedeutung erwies sich schließlich die Nuklealreaktion nach *Feulgen*.

c) Fermentgewinnung und enzymatische Hydrolyse

Ribonuklease wurde nach dem Verfahren von *Brachet* in folgender Weise hergestellt: Rinderpankreas wurde nach sorgfältiger Entfernung aller nicht drüsigen Anteile fein zerkleinert, mit 1—2 Volumen n/10 Essigsäure versetzt und 24 Stunden bei 37° im Brutschrank belassen. Dann wurde 10 Minuten gekocht (Ribonuklease ist nach *Jones und Brachet* im Gegensatz zu fast allen anderen Fermenten hitze-

beständig), filtriert, das Filtrat mit verdünnter NaOH neutralisiert und nochmals filtriert. Daraufhin wurde die Lösung dialysiert und der sich bildende Niederschlag durch Zentrifugieren entfernt. Die gebrauchsfertige Enzymlösung ist, selbst wenn sie unter Toluol aufbewahrt wird, nur sehr beschränkte Zeit haltbar. Ich möchte nicht empfehlen, eine Lösung, die länger als 2 Tage steht, noch für Versuchszwecke zu verwenden. Zu beachten ist ferner, daß die Wirksamkeit der Nuklease starken Schwankungen unterworfen ist. Teils mag dieses auf dem unterschiedlichen Gehalt an wirksamer Substanz in den einzelnen Drüsen, teils auf autolytischen Veränderungen zwischen Schlachtung und Verarbeitung beruhen.

Die Technik der Färbung und Verdauung gestaltete sich zusammengefaßt folgendermaßen: Die in gleichmäßig dünner Schicht angefertigten Blutausrichungen wurden nach Fixierung zur Hälfte gefärbt, der restliche noch ungefärbte Teil in der Fermentlösung eingebracht, in ihr unter variierten Zeitbedingungen belassen und nachträglich gefärbt. So konnte an ein und demselben Präparat die durch die Verdauung hervorgerufene Veränderung eruiert werden. Es erwies sich nicht als zweckmäßig, die Färbung beider Hälften des fixierten Präparates erst nach erfolgter Enzymwirkung gemeinsam vorzunehmen, da die Verdauung im Brutschrank bei 65—70 ° ausgeführt wurde, wobei das Färbungsbild allein schon durch aufsteigende Wasserdämpfe zuweilen Abweichungen von der Norm zeigte.

Zu Kontrollversuchen dienten enzymatische Hydrolysen mit verschiedenen Hyaluronidasen, sowie die Behandlung der Präparate mit Aqua dest. Isotonische Kochsalzlösung schien mir dagegen hierzu nicht geeignet, da die Nukleoproteide in derselben leicht in Lösung gehen.

Befunde

Für die Versuche fanden zunächst Sternalpunktate Verwendung, die ganz frischen Leichen entnommen wurden, so daß autolytische Veränderungen auszuschließen waren. Die in der Literatur mehrfach erwähnten Hinweise, wonach das Sternalpunktat bereits 3 Stunden nach dem Tode erhebliche Abweichungen von der Norm bietet, kann ich nicht bestätigen. Die prozentuale Verteilung der Blutzellen im Knochenmarksausstrich entsprach im allgemeinen der intravital vorgenommenen Punktionen. Das oft sehr starke Vorherrschen der Jugendformen, wie Promyelozyten und Myelozyten, besonders der eosinophilen Reihe, ist auf agonale Ausschwemmung zurückzuführen.

Äthyl-Methylalkoholfixierung: Die Präparate wurden bis zu 2 Stunden der Ribonukleasewirkung ausgesetzt. Zur Färbung fand zunächst Löfflers Methylenblau Verwendung. Bei der vergleichenden Betrachtung beider Hälften der Ausstriche zeigte sich ein verblüffendes Ergebnis: Die Kerne der Granulozyten und ihrer Vorstufen waren nach 2stündiger Verdauung fast vollständig herausgelöst, so daß das Plasma eine der Kernform entsprechende Vakuole umgrenzte, in der lediglich noch ein schwach färbbares Gerüst sichtbar blieb. Ausgenommen davon waren die Zellen der lymphatischen Reihe, deren Kerne unverändert erhalten blieben. Bei genauer Durchsicht des Präparates fanden sich im Blickfeld schließlich noch vereinzelt pyknotische Kerne der Erythrozyten und solche nur wenig veränderte Eosinophiler.

Das Protoplasma der Granulozyten war dagegen nur unwesentlich verändert. Die Basophilie war zwar im allgemeinen bei jugendlichen und bei reifen Zellen abgeschwächt, die homogene Struktur jedoch erhalten. Ledig-

lich die Plasmazellen zeigten eine beträchtliche Abnahme der Farbtinktion. An ihnen konnten des öfteren wabige Aufhellungen, ja Lückenbildung im Plasma beobachtet werden.

Ich betrachtete die 2-Stundengrenze, bei der die fast völlige Auflösung der Kerne der Granulozyten und auch der jugendlichen Erythrozyten im allgemeinen beendet war, als Endstadium und ging nun daran, fließende Übergänge zu erfassen.

Nach ca. 15—20 Minuten wählender Verdauung ließen sich Veränderungen in den Jugendformen, Promyelozyten, Myelozyten und Erythroblasten nachweisen. Ihre Kernstruktur war an einzelnen Stellen zwar stark aufgelockert, aber doch noch gut färbbar. Die reifen Granulozyten boten dagegen ein im Ganzen unverändertes Bild. Oft gewann man den Eindruck, daß Kerne und Plasma sich intensiver mit dem basischen Farbstoff tingierten. Bei längerer enzymatischer Hydrolyse kam es in den Jugendformen zu fortschreitender Kernauflösung und Vakuolenbildung, schließlich zu fast völligem Kernschwund. Bei den reifen Formen der Granulozyten verlief der Vorgang der Kernveränderungen gleichsinnig, aber langsamer. Es blieb hierbei, deutlicher als bei den Jugendlichen, ein schwach tingierbares Kerngerüst übrig. Vereinzelt erschienen auch stab- und segmentkernige Leukozyten im Blickfeld, deren Kerne sich im ganzen noch schwach mit Methylenblau färbten.

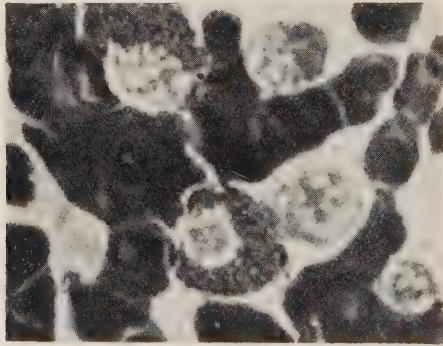


Abb. 1. Knochenmarkspunktat nach 90 Min. Fermentbehandlung. Kerne der neutro- und eosinophilen Myelozyten bereits weitgehend hydrolysiert, Restchromatingerüst noch deutlich darstellbar
(Äthanolfixierung, Eosin-Methylenblau)

Bei Anwendung anderer Färbungen ergaben sich im allgemeinen keine neuen Gesichtspunkte.

Die Methylgrün-Pyroninfärbung nach Unna-Pappenheim entsprach bei Äthanolfixation nicht unseren Erwartungen. Besonders die Kernfärbung war selbst bei gleichartigen Zellen oft unterschiedlich.

Zinkacetat-Formalinfixierung: Bei Anwendung des formalinhaltigen Fixierungsgemisches wiesen die enzymbehandelten Ausstrichpräparate gegen-

über den alkoholfixierten grundsätzliche Unterschiede auf. Nach zweistündiger Enzymeinwirkung blieben die Kerne mit basischen Farbstoffen noch schwach tingierbar. Vakuolenbildung oder weitgehendere Auflösung der Kernstrukturen traten nicht in Erscheinung. Bei stufenweiser verlängerter Verdauung zeigten die Zellen der myeloischen Reihe eine kontinuierliche Abnahme, während die lymphatischen Formen dagegen ihr Farbbindungsvermögen im wesentlichen beibehielten.

Neue Gesichtspunkte ergab die Methylgrün-Pyroninfärbung nach *Unna-Pappenheim*. Im *unbehandelten* Ausstrichpräparat war das Plasma der Lymphozyten und Plasmazellen, ebenso auch der Nukleolus homogen, tiefrot, das der reifen Granulozyten schwächer rot gefärbt. Was die Kerne betrifft, so imponierte vor allem die kräftige Grünfärbung der Lymphozyten

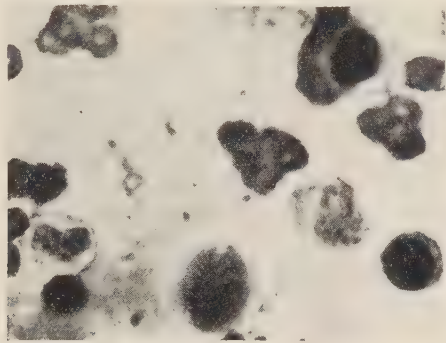


Abb. 2. Knochenmarkspunktat nach 30 Min. Fermentbehandlung. Kerne der Lymphozyten völlig unverändert, beginnende Hydrolyse an den Kernen der Granulozyten. Plasma der Lymphozyten deutlich gefärbt, das der Granulozyten nur noch angedeutet. (Zinkacetat-Formalinfixierung, Methylgrün-Pyronin)

und der pyknotischen Erythrozyten. Die Chromatine der Granulozyten und ihrer Vorstufen tingierten sich demgegenüber in einem zarten Grün. Die Proteine des Parachromatins, die sich bekanntlich mit Pyronin färben, traten bei den einzelnen Zellen in schwankender Ausdehnung in Erscheinung. Nach der Hydrolyse mit Ribonuklease ergaben sich völlig andere Färbefeffekte. Schon nach kurzer Fermentbehandlung zeigten die Kerne der myeloischen Reihe einen Farbumschlag von Grün zu violett. Mit schrittweiser Verlängerung der Verdauung wurde gleichzeitig die Methylgrünbindung immer schwächer, bis schließlich eine ausschließliche Pyroninfärbung der Kernchromatine vorlag. Die Kerne der Lymphozyten und Monozyten behielten dagegen im wesentlichen die Eigenschaft der Methylgrünbindung bei. Nur tingierten auch sie sich schließlich mehr violett, jedoch auch nach langdauernder Hydrolyse nie ausschließlich mit Pyronin. Auch an eosinophilen Zellen und pyknotischen Kernen der roten Blutkörperchen konnte mitunter ein ähnliches Verhalten beobachtet werden.

Am *Protoplasma* der Granulozyten und ihrer Knochenmarksvorstufen war die an nicht hydrolysierten Präparaten mehr oder weniger intensiv in Er-

scheinung tretende Rotfärbung nicht mehr nachweisbar. Es resultierte ein feines, sich durchwegs nur schwach tingierendes, fast homogenes Reststroma ohne Vakuolenbildung. Während die Abnahme der Färbbarkeit an den *Plasmazellen* äußerst eindrucksvoll in Erscheinung trat, kam sie bei den Lymphozyten kaum zur Geltung. Erwähnt sei schließlich noch, daß auch der Nukleolus seine starke Affinität zu Pyronin einbüßte.

Wurde zur Färbung enzymbehandelter Ausstrichpräparate statt des Methylgrün-Pyroningemisches Methylgrün allein verwendet, so tingierten sich mit diesem Farbstoff die Kerne von Lymphozyten und Monozyten, zuweilen auch diejenigen der eosinophilen Granulozyten und ihrer Reifungsstadien.

Versuche an Normalblutausstrichen bestätigten im allgemeinen die am Knochenmark beobachteten Befunde. Die Kernauflösung der reifen Granulozyten erfolgte lediglich etwas langsamer, die Kerne der Lymphozyten blieben gleichfalls erhalten. Bemerkenswert war, daß auch die Kerne der eosinophilen Leukozyten eine größere Resistenz gegenüber Ribonuklease aufwiesen. Euchromatin und Heterochromatin ließen sich nach der Verdauung nicht mehr unterscheiden.

Befunde an leukämischen Blutbildern: Da bei Leukämien auch im strömenden Blut vielfach jugendliche, unreife Zellelemente auftreten, war anzunehmen, daß die enzymatische Hydrolyse in Analogie zu den Vorstufen im Knochenmark verlaufen würde. Bei myeloischen Leukämien erfolgte die Kernauflösung in der Tat schon nach kurzer Zeit. Bereits nach 45 Minuten erhielt man ein Kernnegativ mit nur angedeutet vorhandenem fädigen Gerüst. Im Gegensatz dazu wurden die Kerne der Lymphozyten und Lymphoblasten bei lymphatischer Leukämie kaum verändert. Nur zuweilen trat Vakuolenbildung in größeren Kernformen auf.

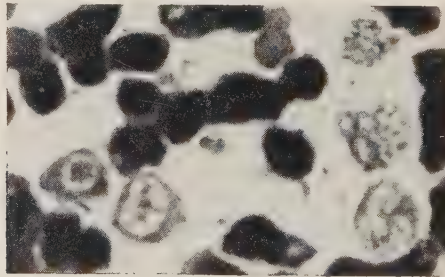


Abb. 3. Knochenmarkspunktat bei myeloischer Leukämie nach 30 Min. Fermentbehandlung. Kerne der jugendlichen und reifen Granulozyten bis auf Restchromatingerüst hydrolysiert.
(Äthanolfixierung, Methylenblau)

In Ausstrichpräparaten von Monozytenanginen herrschten die verschiedenen Formen von Monozyten vor. Daneben fanden sich reichliche Lymphozyten, deren Trennung von den Monozyten oft schwer fiel, während die Granulozyten im Blickfeld zurücktraten. Nach Enzymbehandlung ergab sich

nun der wichtige Befund, daß die Kerne von Monozyten und Lymphozyten sowohl nach Alkohol- wie nach Zinkacetat-Formalinfixierung mit Ribonuklease nicht hydrolysierbar waren. Bei kombinierter May-Grünwald-Giemsa-färbung ließ sich jedoch ein feiner Unterschied feststellen. So zeigten die Kerne der Lymphozyten nicht mehr die ihnen eigene kompakte Chromatinstruktur, sondern eine Auflösung in kleine Schollen, die als dunkel getönte Punkte von verschiedener Größe eng aneinanderlagen. Demgegenüber behielten die verschiedenen Formen von Monozyten ihre Kernfigur ohne wesentliche Veränderung bei. Das gleiche Bild boten auch die sogenannten Übergangsformen, die im übrigen nur sehr schwer von lymphoiden Zellen abzugrenzen sind.

Nuklealreaktion nach Feulgen: Der Anwendungsbereich der Nuklealreaktion beschränkt sich bekanntlich auf die Darstellung von Thymonukleinsäuren im Kernchromatin. Der Ausfall der Reaktion mußte also vor allem im Hinblick auf die Spezifität der Ribonuklease interessieren. Das Normalpräparat zeigte eine elektive Färbung der DNS-haltigen Chromatine in fädig, balkiger Anordnung. Wurde ein derartiger Ausstrich mit Methylenblau oder Giemsa überfärbt, so resultierte eine kompakte Kernfärbung. Nach maximaler Verdauung mit Ribonuklease ergab sich im großen und ganzen ein der ausschließlichen Nuklealreaktion entsprechendes Bild. Die Feulgen-positiven Strukturen am enzymbehandelten Präparat waren ein eindeutiger Beweis, daß die DNS von Ribonuklease nicht angegriffen wurden.

Nach Abschluß der Färbungsstudien wurde es mir ermöglicht, die Versuche auch unter Verwendung der großen Fluoreszenzeinrichtung Lux UV der Fa. Reichert zu ergänzen. In jedem Falle wurden Blutausrichungen nach den oben angegebenen Fixierungen (vor allem Methylalkohol) mit Acridinorange 1 : 10 000 fluorochromiert. Fluoreszenzoptisch zeigten alle nukleinsäurehaltigen Zellbestandteile in erster Linie also die Kerne eine lebhaft orangerote Fluoreszenz. Ein wesentlicher Unterschied hinsichtlich der verschiedenen Zellformen war dabei nicht festzustellen, wenngleich die Intensität der Fluoreszenz proportional dem Nukleinsäuregehalt zu sein schien.

Nach der Verdauung war die Fluoreszenz der Kerne aller Zellen der myeloischen Reihe höchstgradig abgeschwächt oder überhaupt nicht mehr nachweisbar. Vom Vorhandensein dieser Zellen konnte man sich aber bei polychromatischem Licht überzeugen. Im Gegensatz dazu blieb die Kernfluoreszenz der Lymphozyten auch nach Enzymbehandlung fast völlig erhalten. Die Ergebnisse der Färbungsversuche wurden somit auch fluoreszenzoptisch bestätigt.

Es erschien schließlich von großem Interesse, die Wirkungen des *Brachet-Testes* auch elektronenoptisch zu verfolgen. Es stand mir das elektrostatische Elektronenmikroskop der Süddeutschen Laboratorien G. m. b. H., Mosbach, Baden, zur Verfügung *).

*) Die Präparation der Blutausrichungen und die elektronen-mikroskopischen Aufnahmen wurden durch Herrn Dr. *Beyersdorfer* vorgenommen. Ich danke Herrn Dr. *Beyersdorfer* für die Unterstützung und die freundliche Beratung bei meiner Arbeit.

Die Objektträger-Ausstriche wurden, um die Blutelemente im Übermikroskop gut sichtbar zu machen, nach 2 Methoden präpariert. Im ersten Verfahren wurde das Präparat mit Au im Vakuum bedampft und mit Kollodium dünn überschichtet. Die Kollodiummembran wurde nach völliger Trocknung mechanisch oder durch Flußsäure vom Objektträger abgelöst. Dabei blieben

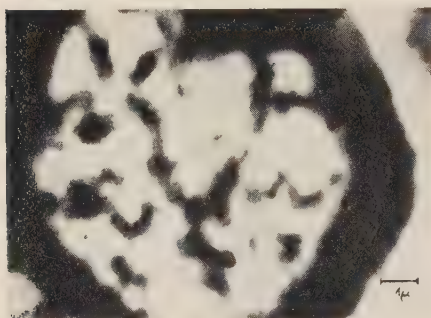


Abb. 4a. Elektronenbild eines jugendlichen Granulozyten aus einem Sternalpunktat nach Verdauung mit Ribonuklease. Au bedampft, Kollodiumabzug. Gesamtvergrößerung 10 000.

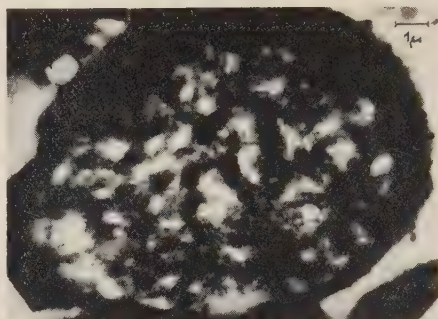


Abb. 4b. Elektronenbild eines Lymphozyten nach Verdauung mit Ribonuklease. Au bedampft, Kollodiumabzug, Gesamtvergrößerung 8000.



Abb. 5. Elektronenbild eines segmentkernigen Leukozyten nach Verdauung mit Ribonuklease. Trolitul-SiO₂-Abdruck, Gesamtvergrößerung 3000.

Der Oberflächenabdruck zeigt deutlich eingesunkene Kernpartien. Diese entsprechen der Lokalisation der Ribonukleotide vor der enzymatischen Hydrolyse.

die Blutkörperchen an ihrer Unterfläche haften, die nunmehr direkt im Elektronenmikroskop abgebildet werden konnten. Es ließ sich nachweisen, daß in den Kernen der Granulozyten durch Verdauung mit Ribonuklease tatsächlich eine weitgehende Hydrolyse mit Vakuolenbildung auftritt, so daß nur noch ein Restchromatingerüst, an das die *Feulgensche* Nuklealreaktion gebunden ist, verbleibt. Bei den Lymphozyten bleibt dagegen die dichte Kernstruktur im wesentlichen erhalten.

Das zweite Verfahren bestand darin, daß wir vom Ausstrich einen Trolitulabzug herstellten, diesen gründlich reinigten und mit Siliciumoxyd (SiO₂) im Vakuum bedampften. Wurde im Anschluß daran das Trolitul mit Benzol

gelöst, so resultierte ein äußerst zartes SiO-Häutchen, auf dem die Oberflächenabdrücke der verschiedenen Formen der Blutkörperchen festgehalten waren.

Epikrise

Die Untersuchungen wurden unter dem Gesichtspunkt durchgeführt, daß die basische Kern- und Plasmafärbung der weißen Blutzellen zum Teil auf dem Vorhandensein von Ribonukleotiden, sei es in freier oder gebundener Form, beruhen könne. Man begnügte sich bisher im allgemeinen mit der Feststellung, daß die Kernchromatine in der Hauptsache aus nach *Feulgen* leicht nachweisbaren DNS bestehen.

Aus den beschriebenen Befunden geht nun hervor, daß diese Ansicht bezüglich der weißen Blutkörperchen einer Revision bedarf. Als wesentliches Ergebnis zeigte sich nämlich, daß zwar die Kerne der Lympho- und Monozyten zum Teil auch die der eosinophilen Leukozyten durch Ribonuklease kaum angegriffen werden und daher wohl überwiegend DNS enthalten. Grundsätzlich anders verhielten sich dagegen die Kerne aller übrigen Granulozyten des Blutes ebenso wie ihre Reifungsstadien im Knochenmark. Diese wurden im Brachet-Test weitgehend bis auf ein Restchromatingerüst hydrolysiert. Daraus geht also ganz allgemein hervor, daß die Zellen der myeloischen Reihe der Granulozyten durch eine andere Zusammensetzung ihrer Kernsubstanzen gekennzeichnet sind. Dabei kann es sich darum handeln, daß der RNS-Anteil entweder überwiegt, oder in einer chemischen Bindungsform vorliegt, der seine enzymatische Hydrolyse viel leichter ermöglicht, als es in den Kernen der Lympho- und Monozytenreihe der Fall ist.

Es sei nun auf die Beobachtungen in den verschiedenen Versuchsreihen im einzelnen näher eingegangen. Erwartungsgemäß bestanden Unterschiede in der enzymatischen Angreifbarkeit der Kernnukleotide je nachdem ob Methanol bzw. Äthanol oder Zinkacetat-Formalin zur Fixierung der Ausstriche verwendet worden war.

Äthanol-Fixierung: Nach kurz dauernder Ribonukleasewirkung ergab sich der interessante Befund, daß die Adsorption basischer Farbstoffe durch die Kerne aller Granulozyten gegenüber dem unbehandelten Präparat gesteigert war. Das Zustandekommen dieses Phänomens läßt sich mit der Beobachtung von *Fischer* und *Schramm* in Einklang bringen, die beim Abbau von Hefenukleinsäuren mit Hilfe kristallisierter Ribonuklease zunächst eine Vermehrung der freien Säureäquivalente feststellten. In guter Übereinstimmung damit ergab sich bei Behandlung von Blut- und Knochenmarksausstrichen mit acidimetrisch abgestuften gepufferten Farblösungen nach *Pischinger* im Anfangsstadium der Verdauung eine Verschiebung der isoelektrischen Punkte der Kernchromatine nach der sauren Seite gegenüber der Norm. Die enzymatische Hydrolyse beginnt daher offenbar mit einer Depolymerisierung der Polynukleotide, wodurch reaktionsfähige Säureradikale frei werden, die zur elektrostatischen Adsorption basischer Farbstoffe fähig sind. Im Anschluß daran kommt es erst zur Hydrolyse der RNS, die in Lösung gehen. Dieser Vorgang ließ sich auch im Blut bzw. Knochenmarksausstrich bei schritt-

weiser Verlängerung der Verdauungszeiten gut verfolgen: Die Kernfärbbarkeit läßt nach, wobei das normalerweise kompakte Chromatingerüst in Form schmaler Balken oder in scholliger Anordnung im Kern gelagert erscheint. Allmählich kommt es dann zu einer fortschreitenden Auflockerung und schließlich zur fast völligen Auflösung der Kerne, in denen lediglich noch das Feulgen-positive Chromatingerüst schwach darstellbar verbleibt.

Im Ablauf dieser Vorgänge waren nun deutliche Unterschiede zwischen der Hydrolyse der Kerne der reifen Granulozyten und jener ihrer Knochenmarksvorstufen zu beobachten. Während die Auflösungsvorgänge an den letzteren bereits nach einer halben Stunde manifest wurden, waren sie an den Kernen der reifen Granulozyten verzögert. Die morphologischen Kernbilder legen die Frage nahe, ob die nach der Enzymwirkung eingetretenen Kernveränderungen tatsächlich nur auf der Lösung von RNS beruhen, ob also die Kerne einen derartigen Reichtum an Ribonukleotiden aufweisen, wie es die Bilder nach lange dauernder Ribonukleasewirkung vermuten lassen.

Es erscheint zweckmäßig, in diesem Zusammenhang auf die mögliche Lokalisation der Ribonukleotide einzugehen. Nach *Straub* und *Caspersson* unterscheiden wir im Ruhekern das intensiv färbbare Heterochromatin vom schwach färbbaren Euchromatin. Die Heterochromatinteile sind sehr reich an DNS und enthalten erhebliche Mengen Eiweiß vom Histontyp. Die euchromatischen Bänder bestehen ebenfalls aus DNS und Proteinen, die teils Albumin-Globulin-, teils Histoncharakter besitzen. Nun hat bereits *Caspersson* die Möglichkeit offen gelassen, daß RNS auch im Heterochromatin lokalisiert sein könnten. Dieser Autor vertritt die interessante Hypothese, daß das Heterochromatin den Nukleinsäurestoffwechsel der Zelle regelt, wobei die Histoneiweiße zum Nukleolus und von dort in das Zytoplasma diffundieren sollen. Da es nun bekannt ist, daß die Nukleinsäuren salzartig an die basischen Eiweißkörper gebunden sind, lassen sich die nach Alkoholfixierung nachweisbaren Auflösungserscheinungen an den Kernen der Zellen der myeloidischen Reihe etwa in folgender Weise deuten:

Wie oben angeführt, werden die Polynukleotide zunächst depolymerisiert und die RNS dann enzymatisch hydrolysiert. Dadurch erfahren aber die Kernhistone eine weitgehende Auflockerung, die im Laufe der Enzymbehandlung zu ihrer Quellung und schließlich Lösung aus dem Kernverband führt. In diesem Sinne spricht die bei *schrittweiser* Verdauung beobachtete Vakuolenbildung. Nur die anfangs in Erscheinung tretenden Kernlücken beruhen daher wahrscheinlich auf einer spezifischen Fermentwirkung. Die bei längeren Versuchen auftretenden Kernveränderungen gründen sich aber offenbar auf physikalische Lösungsvorgänge von Kernproteinen, die durch die verhältnismäßig hohe Temperatur der Enzymlösung begünstigt werden. Der wesentlich raschere Abbau der Kernchromatine der unreifen Granulozyten des Knochenmarks im Vergleich zu dem der reifen Granulozyten des strömenden Blutes ist wohl darauf zurückzuführen, daß Promyelozyten und Myelozyten wie auch andere jugendliche Zellformen durch einen relativ hohen Gehalt an Ribosenukleotiden in den Kernen gekennzeichnet sind.

Formalin-Zinkacetat-Fixierung: Es wurde bereits kurz erwähnt, daß die enzymatische Hydrolyse an Zinkacetat-Formalin fixierten Ausstrichen langsamer und außerdem nicht so weitgehend verlief, wie nach der Äthanol-Härtung. Diese Erscheinung beruht wohl darauf, daß Alkohol ein indifferentes Fixierungsmittel ist, während Formol zu einer Methylierung des Substrates führt. Damit wird aber auch der ursprüngliche Charakter der Ribonukleotide und ihre fermentative Angreifbarkeit beeinflusst und zwar verlangsamt (Verzögerungsfaktor).

Im wesentlichen ergaben sich aber auch in dieser Versuchsreihe durchaus ähnliche Befunde, wie an Alkohol fixierten Präparaten. Die Kernfärbbarkeit mit basischen Farbstoffen nahm mit der Dauer der Hydrolyse ab, bis schließlich das Endstadium in Form nur noch schwach tingierbarer Kernstrukturen erreicht wurde. Die FarbadSORption der Kerne von Lympho- und Monozyten blieb dagegen wiederum im wesentlichen sehr gut erhalten. Bei den Granulozyten war eine Unterscheidung in Euchromatin und Heterochromatin nicht mehr möglich. Dieser Befund spricht durchaus in dem Sinne, daß die Ribonukleotide im Heterochromatin gelagert sind. Das Fehlen von Vakuolenbildungen und weitgehenden Auflösungserscheinungen an den Kernchromatinen, die wir auf unspezifische Quellung und Lösung der Proteine in alkoholfixierten Präparaten zurückgeführt haben, dürfte auf der Formol-Denaturierung der Proteine beruhen. Die Auflösungserscheinungen an den Kernen der reifen Granulozyten traten also gegenüber denjenigen der Alkohol fixierten Reihe etwas zurück. Zur Aufdeckung enzymatischer Wirkungen mußten daher auch Änderungen im Verhalten der Strukturen gegenüber Farbstoffen vor und nach Enzymbehandlung der Ausstriche berücksichtigt werden. Hierzu erwies sich das Methylgrün-Pyroningemisch nach *Unna-Pappenheim* besonders geeignet.

Es traten an den Kernen der Granulozyten einerseits, der Lympho- und Monozyten andererseits folgende charakteristische Färbungseffekte auf: Im *normalen* Blut- und Knochenmarksausstrich färben sich die Kerne beider Zellgruppen lediglich grün, die Pyroninkomponente tritt also *nicht* in Erscheinung. Bereits *nach* kurz dauernder *Enzymbehandlung* ändert sich das Farbbild jedoch insofern, als die Kerne der Granulozyten und ihrer Knochenmarksvorstufen in zunehmendem Maße violett bzw. rot gefärbt erscheinen, d. h. also, daß sie nunmehr das Pyronin an Stelle des Methylgrüns adsorbieren. Lympho- und Monozyten behalten dagegen auch nach langdauernder Enzymbehandlung bei Färbung mit Methylgrün-Pyronin die Fähigkeit der Methylgrünadsorption bei. Damit ergibt sich die Frage, ob für die Adsorption des Methylgrüns durch die Kerne ein spezifisches Substrat verantwortlich gemacht werden kann, oder ob es sich um überwiegend physikalisch-chemische Vorgänge handelt, die die unterschiedliche Adsorption von Methylgrün einerseits und Pyronin andererseits beeinflussen.

Die Befunde an stufenweise verdauten Präparaten, die bereits nach kurzer Enzymwirkung die Methylgrünadsorption vermissen lassen, würden für eine Identität der Chromorezeptoren *Pappenheims* mit den RNS sprechen. Somit würde man eine besondere Affinität des Methylgrüns zu Ribosenukleo-

tiden annehmen müssen. Eine Reihe von Umständen steht aber zu dieser Auffassung im Widerspruch.

Nach *v. Euler* werden die Nukleoproteide schon durch *Kochsalzlösung* leicht in ihre Komponenten zerlegt. Dabei gehen die DNS leichter in Lösung als die fester gebundenen RNS. Färbt man Ausstriche nach NaCl-Behandlung mit Methylgrün-Pyronin, so tritt gleichfalls der Umschlag in der Farbbindung von grün zu rot ein, wie man ihn auch nach der Ribonukleaseverdauung findet. Obgleich also die RNS noch erhalten sind, erfolgt nicht mehr die Methylgrün-, sondern die Pyroninbindung.

Weiterhin seien die Befunde an Lymphozyten und Monozyten erwähnt. Trotz Ribonukleasebehandlung tingieren sich die Kerne dieser Zellgruppen weiterhin grün bis violett, obgleich anzunehmen ist, daß sie überwiegend DNS enthalten.

Diese einander widersprechenden Färbungsergebnisse lassen sich nicht mit der Hypothese einer chemischen Affinität zwischen Methylgrün und RNS vereinbaren. Dagegen werden sie verständlich, wenn man von physikalisch-chemischen Eigenschaften der Farbstoffe des Gemisches ausgeht.

Nach *Möllendorff* unterscheiden sich die beiden basischen Komponenten Methylgrün und Pyronin durch ihre Dispersität und mithin durch ihr Diffusionsvermögen. *Möllendorff* mißt der Färbung der Nukleinsäuren mit basischen Farbstoffen den Charakter einer Niederschlagsfärbung bei, eine Anschauung, die *Pischinger* dahingehend erweiterte, daß für den eingetretenen Flockungseffekt das Ladungsverhältnis der beteiligten Komponenten bestimmend ist. *Möllendorff* nimmt an, daß durch die Flockung (Niederschlagsfärbung) basischer Farbstoffe an sauren, kolloidalen Oberflächen Strukturen erzeugt werden, die das Vordringen eines weiteren Farbstoffes an dieser Stelle verhindern.

Die erwähnten Befunde sprechen daher für eine Deutung im folgenden Sinne: *Die Voraussetzungen für die Adsorption des stärker dispersen Methylgrüns sind solange gegeben, als Nukleinsäuren und Proteine in gebundener Form vorliegen. Wird die Kernstruktur enzymatisch oder durch NaCl-Lösungen infolge Abspaltung von RNS oder DNS aus dem Kernverband gelockert, so ändern sich die Diffusionsbedingungen und das grob disperse Pyronin tingiert nunmehr das weitporige Reststroma im Sinne einer Durchtränkungs-färbung.*

Für den Färbungseffekt ist also außer dem Ladungsunterschied zwischen Farbstoff und Substrat auch die Dichte der Struktur zu berücksichtigen. Man könnte die wechselnden Erscheinungen der Methylgrün- und Pyroninadsorption daher auf verschiedene Durchmesser der Maschen eines Netzes mit an sich elektronegativem Ladungscharakter zurückführen.

Die FarbadSORPTION bei singulärer Methylgrünfärbung beruht auf den gleichen Voraussetzungen. Methylgrün wird nach der Fermentbehandlung nur von Lympho- und Monozyten, gelegentlich auch von Eosinophilen adsorbiert, während die Granulozyten und ihre Knochenmarksvorstufen völlig ungefärbt bleiben. Es tingieren sich also nur die Kerne jener Zellformen, deren Struktur enzymatisch nicht angegriffen wird. Auch dieser Befund

zeigt, daß die Voraussetzungen für die Methylgrünadsorption nur an den kompakten engporigen Kernchromatinen der Lympho- und Monozyten bestehen, nicht aber an den aufgelockerten Restchromatinen der Kerne der myeloischen Zellformen.

Bei der Färbung nach *Unna-Pappenheim* werden durch die Zinkacetat-Formalinhärtung bessere Färbeergebnisse erzielt, während die singuläre Methylgrünfärbung und das Gemisch nach *Unna-Kristallowicz* auch mit Äthanolfixierung ausgezeichnete Bilder ergibt.

Aus dem bisher Gesagten geht zusammengefaßt folgendes hervor: Für den Ribonukleaseeffekt an Kernen und Plasma der Granulozyten, sowie ihrer Knochenmarksvorstufen, sind verschiedene Faktoren von Einfluß. Dazu gehören: Die Art des Fixierungsmittels, die Dauer der enzymatischen Hydrolyse und der Reifungsgrad der Zelltypen. An alkoholfixierten Präparaten entsprechen wohl lediglich die Auflösungsveränderungen, die bereits nach kurz dauernder Hydrolyse an den Granulozyten sichtbar werden, dem tatsächlichen Gehalt der Zellen an Ribonukleotiden. Dagegen dürften bei länger währender Enzymwirkung im *Brachet-Test* auch unspezifische Auflösungserscheinungen an Kernproteinen vor sich gehen.

Nach Formolfixierung sind die Wirkungen der enzymatischen Hydrolyse vor allem mit Methylgrün-Pyronin, aber auch mit Methylgrün allein gut verfolgbar. Ohne daß dem Methylgrün oder dem Pyronin eine spezifische Affinität zu den RNS zuzusprechen ist, gestattet die Anwendung der Färbungen doch charakteristische Unterschiede zwischen verdauten und enzymatisch nicht angegriffenen Kern- und Plasmaelementen der weißen Blutzellen und ihrer Reifungsstadien aufzudecken. Diese bestehen darin, daß die Kerne von Lymphozyten und Monozyten im *Brachet-Test* nicht oder kaum, die der meisten Zellen der myeloischen Reihe dagegen in charakteristischer Weise weitgehend verändert werden.

Diesen Befunden kommt, wie ich glaube, praktische Bedeutung für die Aufklärung unklarer Blutbilder in klinischen Fällen zu. Seit *Ehrlich* ist die morphologische Diagnostik von Blutbildern außerordentlich verfeinert worden. Trotzdem ist auch der rein morphologischen Auswertung eine Grenze gezogen, die offenbar im Bereiche jener kernhaltigen Zelltypen liegt, die im Plasma keine Granula enthalten. Als charakteristisches Beispiel sei ein von *Sandkühler* publizierter Fall zitiert, in welchem eine unklare Leukose bei der Untersuchung durch 12 verschiedene Hämatologen nahezu 12 verschiedene Auswertungen ergab. Wendet man dagegen zur Ergänzung der bisher üblichen Färbemethoden einschließlich der Oxydasereaktion bei der Untersuchung unklarer Blutbilder den *Brachet-Test* an alkoholfixierten Blutaustriichen mit anschließender Methylgrün- oder Methylgrün-Eosinfärbung an, so lassen sich zumindestens die beiden großen Gruppen der *Brachet*-positiven Zellen der myeloischen Reihe gegenüber den *Brachet*-negativen Zellen der lymphatischen Reihe einschließlich der Monozyten in eindeutiger Weise trennen.

Unsere Beobachtungen an den Kernen der Monozyten verdienen besondere Beachtung, da die Diskussion über ihre Herkunft auch heute noch nicht abgeschlossen ist. Ihr gegensätzliches Verhalten im Vergleich mit dem der

Myelozyten im *Brachet-Test* spricht jedenfalls gegen die Herkunft der Monozyten von Elementen der myeloischen Reihe.

Es war zu erwarten, daß der Nachweis von RNS im *Plasma der Leukozyten und ihrer Knochenmarksvorstufen* auf Schwierigkeiten stoßen würde, da seine amphotere Natur stärker als am Zellkern in Erscheinung tritt. So

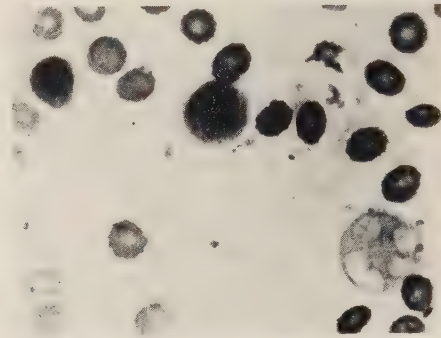


Abb. 6. Normaler Blutausschlag nach 60 Min. Verdauung mit Ribonuklease. Kerne der Lymphozyten fast unverändert gefärbt, Kernsegmente des Granulozyten optisch leer.
(Äthanolfixierung, Eosin-Methylgrün)

finden zur Plasmafärbung sowohl basische (Methylenblau) als auch saure (Eosin) Farbstoffe Verwendung, wobei die letzteren im allgemeinen bessere Färbefeffekte geben. Schon diese Verhältnisse deuten also darauf hin, daß das Protoplasma der Leukozyten im allgemeinen nur einen geringen Gehalt an RNS aufweist. Zum Nachweis bedient man sich zweckmäßig der Methylgrün-Pyroninfärbung. An Normalpräparaten tritt bekanntlich eine mehr oder weniger intensive Pyroninadsorption auf, die an den Plasmazellen am intensivsten ausgebildet ist. Nach Enzymbehandlung ist diese Rotfärbung abgeschwächt bzw. aufgehoben. Auffälligerweise wird nun das Plasma der Lymphozyten am wenigsten von dieser Veränderung betroffen, während im Plasma aller anderen Zellformen nur noch eine schwache Rotfärbung des Grundgerüsts undeutlich erkennbar wird. Dabei zeigen Färbungen mit anderen Farbstoffen, daß die Struktur des Protoplasmas auch nach der Enzymbehandlung im wesentlichen erhalten bleibt und daß es mit Ausnahme der Plasmazellen nicht zum Auftreten von Vakuolen kommt. Diese Befunde sprechen nun dafür, daß die RNS im Plasma der Granulozyten und ihrer Vorstufen in anderer Form als in den Kernen vorliegen. Vielleicht sind sie in freier Form in das Proteingerüst diffus verteilt eingelagert, ohne am Aufbau desselben als Struktursubstanz maßgeblich beteiligt zu sein.

Die Befunde an den einzelnen Zellarten führten zu dem Ergebnis, daß der Gehalt an RNS des Protoplasmas, in welcher Form sie auch letzten Endes vorhanden sein mögen, beträchtliche Unterschiede aufweist. In dieser Hinsicht ist wiederum hervorzuheben, daß die Jugendformen verhältnismäßig mehr RNS als die reifen Formen aufweisen. Unter ihnen ist der RNS-Gehalt des Plasmas der Plasmazellen am größten, derjenigen der Lymphozyten am geringsten.

Zusammenfassung

Es wurden mittels verschiedener Färbemethoden vergleichende Studien an Sternalpunktaten, normalen Blutaussstrichen und leukämischen Blutbildern vor und nach Verdauung mit Ribonuklease (*Brachet-Test*) durchgeführt. Die Untersuchungen führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Die Kerne der Leukozyten enthalten neben Thymo- auch Ribonukleinsäuren. Der Anteil der RNS am Aufbau des chromatischen Kerngerüsts ist nach Zellart und Zellalter verschieden. Einen besonderen Reichtum weisen neutrophile Promyelozyten und Myelozyten, sowie jugendliche Erythrozyten auf, einen geringeren Gehalt besitzen die reifen Granulozyten und die pyknotischen Kerne der Erythrozyten. In Lymphozyten und Monozyten sind RNS nur in sehr geringer Menge enthalten. Damit ergibt sich die Möglichkeit, mit Hilfe des *Brachet-Testes* im Verein mit der Methylgrün-Pyronin- oder der Eosin-Methygrünfärbung die Zellen der myeloischen Reihe gegen die der lymphatischen Reihe abzugrenzen und die Differentialdiagnose unklarer Zelltypen zu erleichtern. Es wird daher auf die Bedeutung des *Brachet-Testes* als diagnostisches Hilfsmittel in der klinischen Hämatologie hingewiesen.

2. Im Plasma aller Leukozyten konnten RNS in geringer Konzentration nachgewiesen werden. Plasmazellen enthalten relativ viel, Lymphozyten relativ wenig RNS.

3. Bei leukämischen Erkrankungen ist der RNS-Gehalt der Kernchromatine der weißen Blutzellen erhöht. Vor allem trifft dies für myeloische, in geringerem Maße aber auch für lymphatische Leukämien zu.

Literatur

- 1 Arnold, J., Münchn. med. Wsch. Nr. 13, 585 (1906); Virch. Arch. Bd. 140, 431 (1895) — 2 Baman-Myrbäck, Meth. d. Fermentforschg. Leipzig 1941 — 3 Behrens, B., Z. physiol. Chem. Bd. 246, 203 (1937); Z. physiol. Chem. Bd. 253, 158 (1938); Z. physiol. Chem. Bd. 258, 27 (1939) — 3a Bormann, P. u. Voit, K., Klin. Wschr. Nr. 24/25, 88 (1946) — 4 Brachet, J., Arch. de Biol. Bd. 53, 207 (1942) — 5 Caspersson, T., Z. w. M. Bd. 53, 403 (1936); Naturwiss. Bd. 29, 33 (1941) — 6 Cesaris-Demel, Virch. Arch. Bd. 195, 1 (1909) — 7 Enzyklopädie d. mikr. Techn. 2. Aufl. Bd. 1 u. 2, Berlin-Wien 1910 — 8 Euler, H. v., Chemie d. Enzyme, 3. Aufl. 2. T. München 1927; Dtsch. med. Wschr. Nr. 25/28, 266 (1948) — 9 Feulgen-Brauns, Pflüg. Arch. Bd. 203, 415 (1924) — 10 Feulgen, R. u. Rossenbeck, H., Z. physiol. Chem. Bd. 135, 203 (1924) — 11 Fischer, F. G., Naturwiss. Bd. 30, 377 (1924) — 12 Fleischacker, H., Klinische Hämatologie, Wien 1948 — 13 Glanzmann, E., Erg. d. Physiol. Bd. 44, 473 (1941) — 14 Goldschmidt, R., Zool. Jb. Bd. 21, 49 (1909) — 15 Gräwitz, E., Meth. d. klin. Blutuntersuchg, 4. Aufl. Leipzig 1911 — 16 Hahn, L., Bioch. Ztschr. Bd. 115, 83 (1943); Bioch. Ztschr. Bd. 318, 123 (1947) — 17 Hammarsten, E., Zur Kenntnis der Nukleinsäureverbindungen, Berlin 1924 — 18 Haurowitz, F., Fortschritte der Biochemie, Basel 1948 — 19 Henning, N., Z. ges. inn. Med. 1948, 660 — 20 Herwerden, M. A. van, Arch. Zellforschg. Bd. 10, 431 (1913); Anat. Anz. Bd. 47, 312 (1914) — 21 Hittmair, A., Dtsch. med. Wschr. 1949, Nr. 4, 107 — 22 Jorpes, E., Über Pentosenukleinsäuren, Akad. Abhandl., Stockholm 1928 — 23 Klein u. Thannhauser, Z. physiol. Chem. Bd. 231, 96 (1935) — 24 Landois-Rose-

mann, *Pysiol. d. Menschen*, 23. u. 24. Aufl. Berlin-Wien 1943 — 25 *Lehnartz, E.*, *Chem. Physiologie*, 8. Aufl. Berlin u. Heidelberg 1948 — 26 *Michaelis, L.*, *Arch. mikr. Anat.* Bd. **94**, 580 (1930) — 27 *Möllendorff, W. v.*, *Münchn. med. Wschr.* Nr. **29**, 933 (1923); *Dermat. Wschr.* Nr. **49/50**, 1417 (1923); *Erg. Anat. u. Entwg.* Bd. **25**, 1 (1924); *Z. Zellfr. u. mikr. An.* Bd. **3**, 1 (1926) — 28 *Mommsen, H.*, *Fol. häm.* Bd. **34**, 50 (1927) — 29 *Nägeli, O.*, *Blutkrankh. u. Blutdiagn.* 5. Aufl. Berlin 1931 — 30 *Nolte, A.*, *Z. Naturforschg.* Bd. **2 B**, H. 7/8, 295 (1947) — 31 *Nordensen, N. G.*, *Acta med. scand.* Bd. **100**, 507 (1939) — 32 *Pappenheim, A.*, *Fol. häm.* Bd. **6**, 51 (1906); *Fol. häm.* Bd. **9**, 572 (1910) — 33 *Päppler, H. W.*, *Beitr. path. Anat.* Bd. **87**, 659 (1931) — 34 *Petersen, H.*, *Histologie u. mikr. Anat.*, München 1935 — 35 *Pischinger, A.*, *Z. Zellf. u. mikr. An.* Bd. **3**, 169 (1926); *Z. Zellf. u. mikr. An.* Bd. **5**, 347 (1927) — 36 *Rohr, K.*, *Schw. med. Wschr.* Nr. **29**, 685 (1940); *Das menschl. Knochenmark*, Leipzig 1940 — 37 *Romeis, B.*, *Mikr. Technik*, 15. Aufl. München 1948 — 38 *Sandkühler, S.*, *Dtsch. med. Wschr.* **1949**, Nr. 7, 204 — 39 *Schiller, W.*, *Z. Zellforschg.* Bd. **11**, 63 (1930) — 40 *Schmidt, W. J.*, *Erg. d. Physiol.* Bd. **44**, 27 (1941) — 41 *Schramm, Bergold, Flammersfeld*, *Z. Naturforschg.* Bd. **1**, 328 (1946) — 42 *Schridde, H. u. Nägeli, O.*, *Die hämatologische Techn.* Jena 1910 — 43 *Schulten, H.*, *Klin. Hämatologie*, 4. Aufl. Stuttgart 1948 — 44 *Schwarz-Karsten, H.*, *Dtsch. med. Wschr.* Nr. **43**, 1820 (1927) — 45 *Stern, K.*, *Yale J. Biol. a. Med. (Am.)* **19**, 6 (1947) — 46 *Straub, J.*, *Naturwiss.* Bd. **31**, 97 (1943) — 47 *Tamura, O.*, *Arch. Zellforschg.* Bd. **17**, 131 (1923) — 48 *Voit u. Borgard*, *Klin. Wschr.* **21**, 754 (1939) — 49 *Voit u. Daiser*, *Klin. Wschr.* Nr. **45**, 1646 (1936) — 50 *Wermel, E.*, *Z. Zellforschg.* Bd. **5**, 400 (1927) — 51 *Zeiger, K.*, *Z. Zellforschg.* Bd. **10**, 481 (1930); *Z. w. M.* Bd. **47**, 273 (1930); *Z. m. M.* Bd. **53**, 279 (1936); *Z. m. M.* Bd. **54**, 82 (1937)

Über eine Periodik der Erregbarkeitsänderung im abklingenden Anelektrotonus

Von R. Dittler und G. Billing

Mit 6 Abbildungen

Eingegangen am 19. April 1949

Über die *Nachwirkung* des galvanischen Stromes am erregbaren Gebilde war bisher nur bekannt, daß sie mit einem Umschlag der durch den Stromfluß („elektronisch“) veränderten polaren Erregbarkeiten in ihr Gegenteil Hand in Hand geht: die (primäre) Erregbarkeitssteigerung im kathodischen Gebiet macht einer (sekundären) Erregbarkeitsminderung Platz, während sich im Bereich der Anode nachträglich eine Erregbarkeitssteigerung entwickelt (E. Pflüger¹). Im elektrischen Bild zeigte sich dieser Vorgang von einem mit der Stromöffnung einsetzenden sehr steilen Zusammenbruch der an den Polstellen zuvor ableitbaren elektrotonischen Potentiale begleitet, mit der Besonderheit, daß der Anelektrotonus für einige Zeit geringe Ladungsrückstände zu hinterlassen pflegt (s. z. B. bei L. Pohlschmidt²). Über den zeitlichen Ablauf des Erregbarkeitsumschlages unter der Anode wurde durch die Untersuchung von R. Dittler und H. Kloos³ festgestellt, daß er sich in meßbarer Weise verhältnismäßig träge vollzieht, indem Teilbeträge der abklingenden (primären) Untererregbarkeit nach der Stromöffnung zunächst sicher zu erfassen sind: der Zustand der natürlichen Erregbarkeit wird am kuraresierten Muskel erst nach etwa 60 msec durchschritten, das Maximum der (sekundären) Übererregbarkeit nach durchschnittlich 200 msec erreicht.

In Versuchen, die eine Trennung der Doppelschichten- und der Diffusionspolarisation bei diesen Vorgängen zum Ziele hatten, dabei aber mit größerer Stärke der polarisatorischen Vorbeeinflussung arbeiteten und sich über eine viel längere Beobachtungsdauer erstreckten, zeigte sich nun, daß die sekundäre Übererregbarkeit unter der Anode u. U. nicht einfach stetig zum natürlichen Erregbarkeitswert abfällt, sondern daß sich ihr eine Phase von Untererregbarkeit anschließt, in der, je nach den Stromstärkeverhältnissen, selbst zuvor maximalwirkende Prüfreize unschwellig werden. Dieser Befund im Abklingen eines Elektrotonus hat als ein Novum zu gelten. Die Prüfung im einzelnen ergab, daß die „negative Phase“ sich (nach Minuten) entweder selbst zur natürlichen Erregbarkeit ausgleicht oder sogar

von einer zweiten positiven Welle gefolgt ist, die dann ihrerseits erst den Erscheinungsvorgang abschließt. Bei passendem Verhältnis der Polarisierungs- und Prüfreizstärke kann sich dieser Ablauf, ohne Unterschreitung der Prüfreizschwelle, ganz im „sichtbaren Bereich“ halten, so daß Kurvenbilder der aus Abb. 1 ersichtlichen Art entstehen, die zugleich die erste

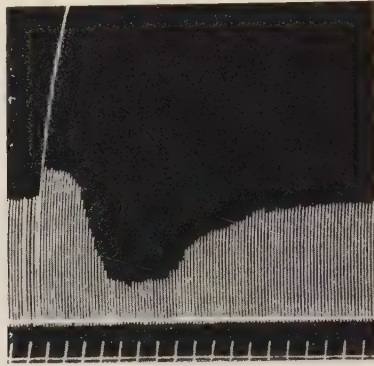


Abb. 1. Sartoriusversuch vom 24. 7. 1937. Tp 23° C. Zeit in min.
Erste vollgelungene Darstellung der anelektrotonischen Welle: 6. Pol., 60×6". Die übermaximale Zuckung entspricht der Schließung des elektrotrotonisierenden Stromes (= SZ +), keine Öffnungsreizwirksamkeit (= ÖZ -).

lückenlos gelungene Darstellung einer Periodik im Abklingen des Anelektronus festhält. Für sie führte sich im Laboratoriumsgebrauch die (vorläufige) Kurzbezeichnung „anelektronische Welle“ ein, die auch im folgenden benutzt sei.

Die bis jetzt vorliegenden weiteren Beobachtungen waren auf den Versuch einer Entscheidung darüber abgestellt, ob der nachweisbare Erregbarkeitsverlauf dem Vorgang der anodischen Depolarisation als solchem eignet, oder ob er eine die Grenze eigentlich physiologischer Umstimmung überschreitende Alteration des lebenden Gebildes vorausgesetzt und ein durch experimentelle Nebenwirkungen bedingtes Kunstprodukt darstellt (Parabiose im Sinne N. E. Wedenskis⁴). Hier eine sichere Grenze zu ziehen, scheint schwierig, doch kann auf Grund der Erfahrungen immerhin schon einiges dazu gesagt werden.

Der Untersuchungsgang war der, unter planvoller Abwandlung der Einzel-faktoren die Bedingungen zu ermitteln, die zur Ermöglichung des Phänomens unerlässlich sind und bei ihrem Zusammentreffen umgekehrt sein Auftreten sicher gewährleisten. Als Test wurde zunächst nur die Größe der nach anodischer Vorbehandlung des Präparates bei Reizung mit submaximal eingestelltem Prüfreiz vor Schließung und nach Öffnung des elektronisierenden Stromes sich ergebenden Muskelzuckungen herangezogen, die Beurteilung also ausschließlich auf die Erregbarkeitsprüfung gestützt. Der Versuch unmittelbarer objektiver Darstellung von Elektrotonusschwankungen unter

den gleichen Bedingungen blieb einer besonderen Untersuchung vorbehalten. Auch die vergleichende Prüfung der sekundären Vorgänge an der kathodisch vorbehandelten Muskel- oder Nervenstelle lag außerhalb des Versuchsplanes.

Methodik

Abb. 2 erläutert die im Versuch benutzte Apparatur und ihre Schaltung. Die zur Elektrotonisierung (Polarisierung) dienende Spannung wurde der Batterie B I (7.6—7.8 Volt) entnommen und am Potentiometer I in der gewünschten Höhe abgegriffen. Der links von der Wippe ohne Kreuz (W) liegende Teil der Anordnung (Pr) entspricht dem von F. Scheminzky⁵ angegebenen Gerät zur Erzeugung periodischer Kondensatorentladungen und

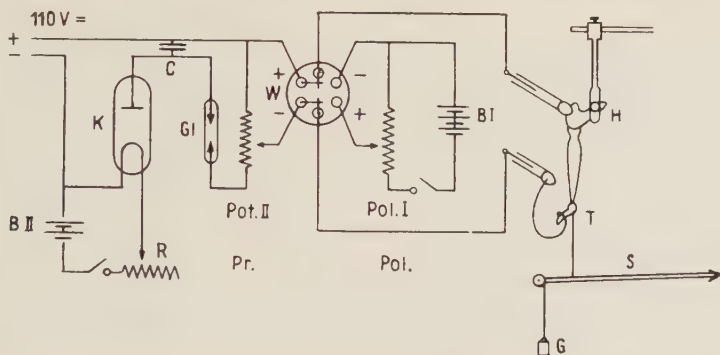


Abb. 2. Versuchsanordnung.

B I Batterie des Polarisierungskreises (7.6—7.8 V), B II Reizstrombatterie, C Kondensator (0.1 mF), G Gewicht (20 g), Gl Glimmlampe, H Hüftknochen in Klemmschraube, K Elektronenröhre, P I Potentiometer zum Abgriff der Polarisierungsspannung, P II Potentiometer zum Abgriff der Prüfreizspannung, R Heizstromwiderstand, S Schreibhebel, T Tibia, W Wippe ohne Kreuz.

lieferte über die Glimmlampe (Gl) in etwa 10sec-Abstand sich folgende gleichstarke Prüfreize, die am Potentiometer II auf submaximale Wirksamkeit eingestellt wurden. Sie blieben für die Versuchsdauer unverändert und wirkten an dem schmalen (unteren) Muskelende (bei T) bzw. der muskelnahen (differenten) Elektrode am Nerven, wo die Anode des aufsteigenden elektrotonisierenden Stromes lag. Durch die Wippe ohne Kreuz war ermöglicht, durch einfachen Handgriff den elektrotonisierenden Strom und die Prüfreize wechselweise dem Präparat zuzuleiten. Der typische Versuch verlief so, daß bei Lage der Wippe nach links zunächst am natürlich bestimmten Präparat eine Schar submaximaler Zuckungen ausgelöst und verzeichnet wurde, um die Bezugsgröße der Reizbeantwortung festzulegen. Es folgte — durch Umlegen der Wippe nach rechts — die nach Stärke und Dauer genau dosierte Elektrotonisierung der Reizstelle, nach deren Abschluß der Muskel — durch Zurücklegen der Wippe nach links — den periodischen Prüfreizen wieder ausgesetzt wurde. Die beim letzten Wechsel bis zum Eintreffen des ersten Prüfreizes verstreichende Zeit wurde von Fall zu Fall innerhalb enger Grenzen (1—2 sec) konstant gehalten.

Die Bestimmung der jeweils zur Wirkung gebrachten Polarisierungsstärke nach Volt und Milliampères wurde, da absolut verbindliche Wertangaben zunächst entbehrlich schienen, vor Eintritt in die Versuche vereinfachend so vorbereitet, daß die Apparatur an mehreren Muskeln durchschnittlicher Größe für die verschiedenen Potentiometerstellungen durchgeeicht und aus den (wenig schwankenden) Werten die Mittelwerte errechnet und in einer Tabelle niedergelegt wurden. Aus ihr waren die im Versuch in Frage stehenden Spannungs- und Stromstärkenwerte dann rasch annäherungsweise zu entnehmen. Anstelle ihrer Wiedergabe genüge der Hinweis, daß zwischen den Skaleneinstellungen 10 und 100 des Potentiometers die Spannungen, nahezu linear, von 0.55 auf 7.6 V, die Stromstärken von 0.015 auf 0.150 mA wuchsen. In die Kurvenlegenden ist außer diesen Daten die Angabe aufgenommen, um die wievielte Polarisierung des Präparates es sich handelte, so daß z. B. die Kurz kennzeichnung 2. Pol., $60 \times 3''$ bedeutet, daß das Präparat nach Abklingen der Wirkung einer ersten Polarisierung einer zweiten anodischen Vorbeeinflussung bei 4.5 V = etwa 0.075 mA für die Dauer von 3 sec ausgesetzt war. Auch die Festhaltung der primären Reizwirkungen des polarisierenden Stromes war des Interesses wert. Mit einer erneuten Polarisierung wurde geflissentlich immer zugewartet, bis die Nachwirkung der vorhergegangenen, gemessen an den Zuckungshöhen des Muskels, völlig abgelaufen schien, was bis zu 40 Minuten erfordern konnte.

Die zu beschreibenden Versuche, die seitdem nach verschiedenen Seiten weiter ausgebaut werden, fielen in den Sommer 1947 und wurden vorzugsweise am kuaresierten Froschsartorius durchgeführt, sogleich aber auch auf den nichtkuaresierten Skelettmuskel sowie den markhaltigen Nervenstamm übertragen. Als Versuchstiere standen mittelgroße einheimische Temporarien unterschiedlicher Herkunft zur Verfügung. Zum Schutz gegen Vertrocknung waren die Präparate mitsamt den Elektroden in einer feuchten Kammer untergebracht.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der Untersuchung waren äußerst vielgestaltig, so daß der Versuch einer theoretischen Wertung der anelektrotonischen Welle als reizphysiologischer Erscheinung noch mit aller Zurückhaltung zu geschehen hat. Wenn er trotzdem gewagt wird, so nur, um zu einigen der wesentlichen Punkte eine eigene Meinung zu gewinnen und diese allgemein zur Diskussion zu stellen. Die in knapper Auswahl beigefügten Kurvenbelege mögen der Veranschaulichung des Gesagten dienen.

1. Zuvörderst sei ausgesprochen, daß die anelektrotonische Welle keinen gelegentlichen Zufallsbefund, sondern eine an Nerv und Muskel in jedem Fall zu erzeugende Reaktionsform darstellt. Die Verhältnisse liegen offenbar so, daß eine schwache anodische Vorbehandlung schlechthin die bekannte sekundäre Erregbarkeitssteigerung nach sich zieht, die sich innerhalb weniger Minuten in kontinuierlichem Abfall ausgleicht: die anelektrotonische Welle fehlt. Wird jedoch die Stärke der anodischen Einflußnahme in bestimmtem Maße erhöht, so kommt — unbedingt und ohne Ausnahme —

der Umschlag in eine sekundäre Untererregbarkeit („depressive Phase“) hinzu, aus der heraus erst die natürliche Erregbarkeit sich wiederherstellt (oder sogar nochmals überschritten wird). Die Darstellung einer im vollen Ablauf sichtbaren Welle ist lediglich an ein günstiges Verhältnis der Polarisierungs- zur Prüfreizstärke gebunden.

Abb. 3 a entstammt der ersten Polarisierung eines frisch präparierten vollkuraresierten Sartorius. Sie ergibt den Beweis dafür, daß der Muskel schon nach 4 sec langer erstmaliger Durchströmung mit 0.053 mA die Wellenbildung zeigen kann: an die zunächst deutliche Überhöhung schließt sich ein jäher Absturz der Erregbarkeit unter die Schwelle des Prüfreizes an, aus der sich der Muskel, wie nachträglich ersichtlich wurde, selbständig „erholt“ hätte, wenn der Kurvenverlauf nicht durch (voreilige) Prüfreizver-

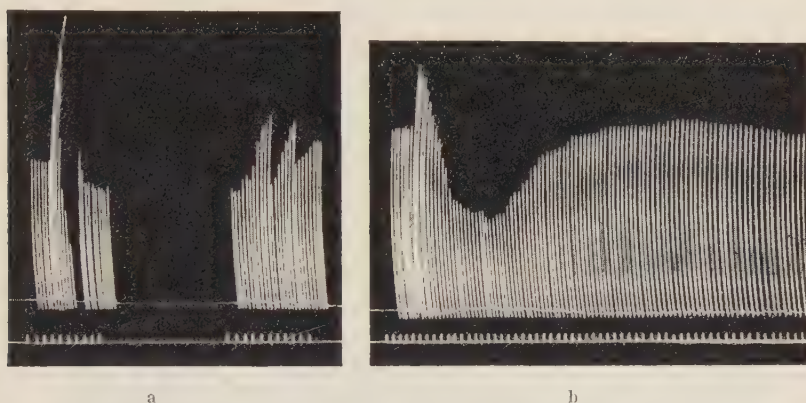


Abb. 3. Sartoriusversuch vom 26. 9. 47. Tp 22° C. Zeit in min.
 a) 1. Pol., 60×4". Nach Absinken unter die Schwelle Prüfreizverstärkung, die noch in die absteigende Phase fiel. Schreibfläche sodann manuell weitergerückt. Nach dem Kurvenanstieg Prüfreiz zweimal abgeschwächt, das 2. Mal auf ursprüngliche Stärke.
 b) 4. Pol., 30×3" (Gesamtwellenverlauf).
 Bei a) und b): SZ +, ÜZ —.

stärkung gestört worden wäre. Diese Reizverstärkung fiel eben noch in die Phase absinkender Erregbarkeit, doch schloß sich ihr (sogleich nach der manuellen Verschiebung der Schreibfläche, s. Legende) ein Wiederanstieg der Erregbarkeit an. Die nach zweimaliger, zuletzt auf den Wert vor der Polarisierung zurückführender Schwächung des Prüfreizes überhöht bleibenden Zuckungen zeigen den Ablauf einer „positiven Nachwelle“ an. Im Anschluß an die 4. Polarisierung verzeichnete derselbe Muskel die Kurve 3 b, bei der nach zwei weniger glücklichen Versuchen eine störungsfreie Darstellung des Gesamtverlaufes (mit ebenfalls angedeuteter positiver Nacherhebung) gelang.

2. Bei diesem, das allgemeine Ergebnis kennzeichnenden Muskelverhalten wird man es kaum für wahrscheinlich halten, daß die anelektrotonische Welle den Eintritt eines unphysiologischen Zustandes (Parabiose) zur Voraussetzung hat. Ihr Auftreten nach erstmaliger keineswegs extremer anodischer Umstimmung legt diese Auffassung mindestens nahe. Dem tut auch

die Erfahrung keinen Eintrag, daß die für die Welle am frischen Muskel benötigten Stromdosen unter der Kathode schon in das Bereich der „depressiven“ Wirkung hineinreichen können, denn der primäre Anelektrotonus wies gegenüber den niedrigeren Polarisationsstufen keinerlei Besonderheiten auf, sondern entwickelte sich ohne Vorzeichenumkehr in stetig steigendem Anwachsen aus ihnen. Auch sei auf die günstigenfalls volle Reversibilität der experimentell veränderten Stimmungslage verwiesen, aus der Nerv und Muskel spontan in den Ausgangszustand zurückkehren. Wenn abweichend hiervon mehrfach (an der Erregbarkeit erkennbare) Umstimmungsdauerrückstände zur Beobachtung kamen, die so stabil waren, daß sie selbst wieder zur Ausgangslage erneuter Wellenbildung gemacht werden konnten, so sind diese nach der allgemeinen Erfahrung doch nicht den Bedingungen an sich zuzurechnen, auch wenn sie im Einzelfall, wie in Abb. 4, möglicherweise durch Addierung begünstigend wirkten. Ein Beispiel für das Stabilwerden relativer Untererregbarkeit ist im Gegensatz dazu

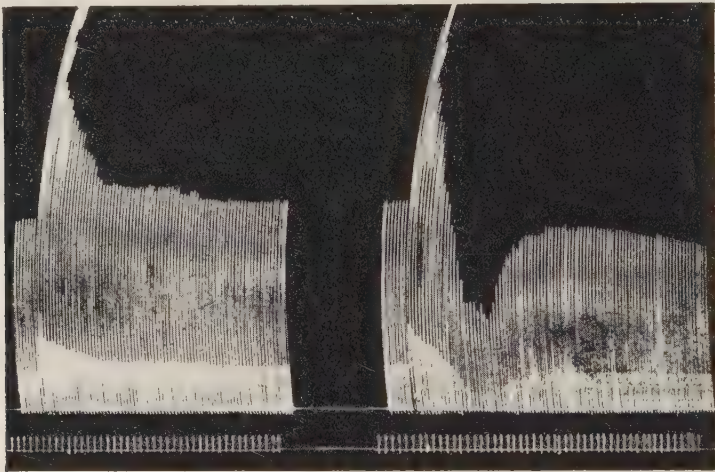


Abb. 4. Sartoriusversuch vom 13. 8. 47, Tp 17° C. Zeit in min.

a) 1. Pol., 30 × 30"

b) 2. Pol., 30 × 30"

Bei a) und b): SZ +, ÖZ —.

in Abb. 5 gegeben. Einzuräumen wäre nur, daß in extremen Fällen dieser Art in der Ausbildung des neuen Dauergleichgewichtes der Übergang zu einer Parabiose gesehen werden könnte. Indessen finden sich im Schrifttum auch sonst schon mehrfach Zeichen solcher Dauerstabilisierung in neuer Gleichgewichtslage nach anfänglicher regressiver Änderung beschrieben, ohne daß von einer Parabiose die Rede war. Spielt doch in diese Zusammenhänge auf das engste auch der Vorgang der Adaptation hinein, einer spezifisch-physiologischen Leistung also, deren auch das isolierte Organ noch sehr wohl fähig ist.

3. Sowohl für die Spannung wie für die Dauer des elektrotonisierenden Stromes scheint es eine untere und eine obere Grenze zu geben,

deren Unter- bzw. Überschreitung den angestrebten Erfolg vereitelt, wogegen innerhalb der vorgezeichneten Grenzen ein Zuviel oder Zuwenig des einen Wirkfaktors durch den anderen ausgeglichen werden kann. Auch der Nachweis, ob im einzelnen Fall, entsprechend den individuellen Eigenschaften des Präparates, ein Optimum der Stromdosierung im ganzen besteht

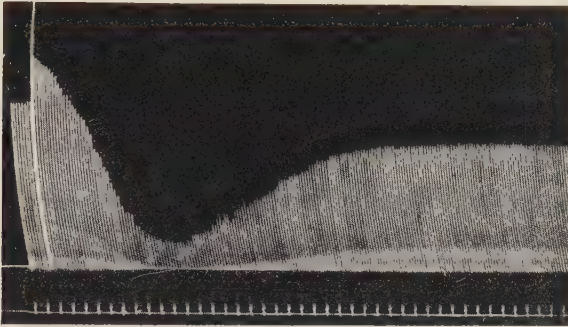


Abb. 5. Sartoriusversuch vom 17. 10. 47, T_p 14° C, Zeit in min.
4. Pol., $40 \times 5''$. SZ +, ÖZ —.

(das theoretisch zu fordern wäre), ist trotz darauf gerichteter Bemühungen bei der Streuung der Befunde selbst an einem und demselben Muskel nicht sicher gelungen. Es kam lediglich zum Ausdruck, daß die zu niedrige Stromspannung auch bei stark protrahierter Wirkdauer ohne Erfolg blieb, während die zu hohe leicht zu irreversiblen Schäden führte, sowie daß bei gegebener Strommenge eine Spannungserhöhung im allgemeinen die Steilheit und Tiefe der depressiven Phase stärker beeinflusste als eine Verlängerung der Durchströmungsdauer, selbst wenn das Zeitspannungsprodukt hierbei über seinen Wert vergrößert wurde.

4. Neben alledem können für das Auftreten der Wellenbildung offenbar auch noch andere Momente bestimmend sein, die bis jetzt nicht erfaßt sind. So kam es vor, daß ein bestimmtes Maß anodischer Vorbehandlung erst bei der zweiten Applikation eine anelektrotonische Welle bedingte, ohne daß Rückstände der ersten Polarisierung erkennbar waren. Für die Annahme latenter Umstimmungsrückstände in solchen Fällen würde schon die Beobachtung sprechen, daß von zwei aufeinanderfolgenden Polarisierungen die zweite nach scheinbar vollem Wirkungsausgleich unter denselben physikalischen Bedingungen einen steileren und tieferen Erregbarkeitsabfall bewirken konnte.

5. Die beschriebenen Erscheinungen sind nicht an die Kuraresierung des Muskels gebunden, sondern treten unter den gleichen Voraussetzungen in derselben Ablaufsform auch beim direktgereizten nichtkuraresierten Muskel auf. Eine besondere Bereitschaft zur Bildung der anelektrotonischen Welle erwies der motorische Nervenstamm, dem zugleich die Fähigkeit zur Einstellung neuer Dauergleichgewichte in hohem Maße eigen ist. Die in Abb. 6

wiedergegebenen, vom indirektgereizten Froschgastroknemius stammenden Kurven entsprechen der 27. u. 29.—33. (!) der vom gleichen Präparat innerhalb 7 Stunden gewonnenen 36 (regulären) Wellenbildungen. Der zeitlich deutlich gedrängtere Verlauf der Gesamterscheinung ist offensichtlich.

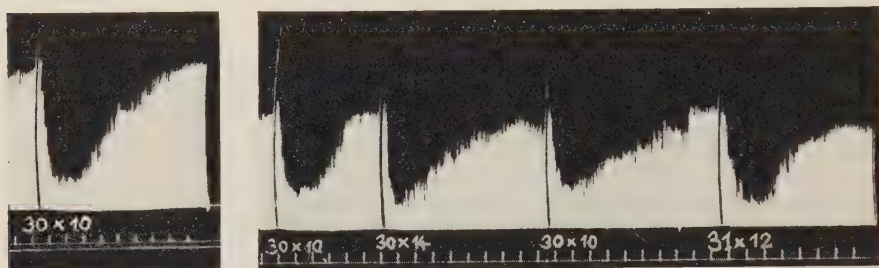


Abb. 6. Versuch vom 6. 11. 47, Gastroknemius, Reizung vom Nerven aus, dem im Reizstromkreis ein Widerstand von 50 000 in Serie vorgelegt war. Die Reizbedingungen finden sich am Fuß der Kurven vermerkt. $T_p 10^{\circ} C$, Zeit in min.

6. Die Frage nach der Möglichkeit einer Einordnung der neu beschriebenen Wellenbildung unter die für Elektrotonus und Erregung heute gültigen Membranvorstellungen (s. z. B. bei U. Ebbecke⁶) hat so lange als verfrüht zu gelten, als das Verhalten des abklingenden Anelektrotonus nicht unmittelbar nach seiner elektrischen Äußerungsform festgelegt ist. Solche Untersuchungen sind im Gang und sollen darüber entscheiden, ob der (vorläufig) als „anelektrotonische Welle“ bezeichneten Erscheinung dieser Name auch physikalisch geprüft, buchstäblich, zukommt. Gewiß handelt es sich um einen Vorgang, der in dem Verschwinden eines vorher bestehenden Anelektrotonus offenbar seinen Anstoß findet, doch wäre es ja möglich, daß sich das in der Erregbarkeitsänderung erfaßte spezifisch-physiologische Geschehen von dem Änderungsgang der zusammenbrechenden physikalischen Spannung am Orte der gewesenen Anode weiterhin völlig löste. Schon die von Dittler und Kloos messend verfolgte, nach der Stromöffnung sich entwickelnde („klassische“) Erregbarkeitssteigerung, die nicht von einem Kathodischwerden der Prüfstelle begleitet ist, weist auf die (wohl adaptativ begründete) Möglichkeit eines solchen Auseinandergehens hin, bei dem die physikalisch „ausgelöste“ Funktion einer verwickelteren Eigengesetzlichkeit folgt.

7. Was die anelektrotonische Welle vor allem kennzeichnet, ist ihr äußerst träger Verlauf, wie er bei periodischen Vorgängen am isolierten Organ u. W. bisher nicht beobachtet ist. Die Erscheinungen des periodischen Erregungsablaufes beim „Nerven-“ und „Muskelrhythmus“ (S. Garten^{7, 8}, R. Dittler^{9, 10}, L. Pohlschmidt²) gehören naturgemäß einer ganz anderen Größenordnung an, desgleichen das periodische Abklingen der Helligkeitserregung nach kurzdauernder Netzhautreizung (J. Purkinjé¹¹, C. v. Heß¹², R. Dittler und J. Eisenmeier¹³). Auf der Suche nach äußerlich vergleichbaren Fällen wäre höchstens an die Tonusschwankungen glattemuskuliger Organe (Gefäßmuskeln, Muskeln des Magendarmtraktes, Milz) zu denken, die wohl auch im isolierten Zustande solche Schwankungen

durchlaufen können. Im übrigen können manche im Gesamtorganismus auf regulatorischer Grundlage beruhende periodische Vorgänge, wie langhingezogene *Traube-Mayersche* Blutdruckwellen (auch in der jüngst von *K. Wezler*¹⁴ beobachteten Form) oder die Perioden der *Cheyne-Stokesschen* Atmung zwar einen ähnlich gedehnten Verlauf zeigen, haben zu den hier behandelten Erscheinungen jedoch keine Wesensverwandtschaft. Äußerlich und innerlich am nächsten dürften ihnen die periodischen Vorgänge nach längerer gleichartiger Belichtung des Auges stehen, wo das abwechselnde Auftauchen und Wiederverschwinden der „dauerhaften“ negativen Nachbilder, ebenso wie dort, einen periodischen Verlauf des Abklingens einseitig gerichteter umstimmender Reizeinwirkungen (mit allerdings auch nicht annähernd so langer Periode) erkennbar werden läßt. Entsprechendes darf vielleicht für die Erscheinungen des Nach-Nachnystagmus (*M. H. Fischer* und *E. Wodak*¹⁵) geltend gemacht werden.

Zusammenfassung

Bei Verwendung elektrotonisierender Ströme nicht zu geringer Stärke und Wirkungsdauer kommt am Orte der Anode ein bisher unbekanntes elektrotonisches Phänomen zustande: die nach Stromöffnung auftretende („sekundäre“) Erregbarkeitssteigerung klingt nicht stetig ab, sondern sie tut dies in periodischem Verlauf, indem sich eine Phase stark herabgesetzter Erregbarkeit anschließt, die ihrerseits erst zum natürlichen Erregbarkeitswert zurückführt; auch eine zweite Durchschneidung dieses Wertes in umgekehrter Richtung wurde beobachtet. Als Test für diese Wellenbildung wurde zunächst ausschließlich die Höhenänderung durch periodisch wiederkehrenden Prüfreiz ausgelöster submaximaler Muskelzuckungen bei direkter wie auch indirekter Reizung herangezogen. Der Gang der ablaufenden Erregbarkeitsänderung ist äußerst träge und zieht sich bis zur Wiederkehr stationärer Verhältnisse beim kuraresierten Muskel über 20—30 Minuten hin; beim Nerven vollzieht er sich etwa 5mal rascher.

Der Schwerpunkt der neuen Erkenntnis wird in der Nachweisbarkeit der *depressiven Phase* nach anfänglicher Erregbarkeitssteigerung gesehen. Indem auch der überlebende Muskel (und Nerv) aus ihr in der Regel wieder zu höheren Erregungsleistungen ansteigt, ist schon ihr Auftreten als Zeichen periodischen Geschehens zu werten.

Für die Auslösung der anelektrotonischen Welle ist ein bestimmtes Mindestmaß anodischer Vorbehandlung des Präparates gefordert, für das bei der großen individuellen Schwankung der Bedingungen von Fall zu Fall allgemeingültige zahlenmäßige Angaben nicht möglich sind. Es handelt sich um einige Zehntel-mA für 3 bis 30 sec. Innerhalb dieses Strommengenbereiches zeigten sich größere Stromstärken bei geringerer Wirkungsdauer im ganzen für den Erfolg vorteilhafter als die längere Einwirkung geringerer Stromstärken. Günstige Wahl dieser Größen vorausgesetzt, kommt die Wellenbildung schon nach der ersten Durchströmung zustande. Ihre

lückenlose kurvenmäßige Darstellung ist außerdem an die passende Einstufung der Prüfreizstärke gebunden.

Ob die anelektrotonische Welle eine die Grenzen des Physiologischen überschreitende Alteration des lebenden Gebildes zur Voraussetzung hat, ist noch nicht bestimmt zu beantworten. Dem Tatbestand, daß die entsprechenden Stromdosen am Orte der *Kathode* vielfach schon in das Bereich der „depressiven“ Wirkung hineinreichen, steht die Feststellung gegenüber, daß der *primäre Anelektrotonus* gegenüber den niedrigeren Polarisationsstufen dabei keinerlei Besonderheiten zeigt, sondern sich in stetigem Anwachsen seiner *hemmenden* Wirkung, gleichgerichtet, aus ihnen entwickelt.

Literatur

- 1 Pflüger, E., Elektrotonus, Berlin 1859 — 2 Pohlschmidt, L., Z. Biol., **101**, 351, 1943 — 3 Dittler, R. u. Kloos, H., Pflügers Arch., **249**, 593. 1948 — 4 Wedensky, N. E., Pflügers Arch., **100**, 1. 1904 — 5 Scheminzy, F., Pflügers Arch., **213**, 119. 1926 — 6 Ebbecke, U., Pflügers Arch., **203**, 336. 1924 — 7 Garten, S., Abh. d. kgl. Sächs. Ges. d. Wiss., math.-phys. Kl., **26**, 1901 — 8 Garten, S., ebda. **40**, 1908 — 9 Dittler, R., Pflügers Arch., **125**, 111. 1908 — 10 Dittler, R., Pflügers Arch., **139**, 279. 1911 — 11 Purkinjé, J., Beobachtungen und Versuche zur Physiologie der Sinne, **2**, 110. Berlin 1825 — 12 Heß, C. v., Pflügers Arch., **95**, 15. 1903 — 13 Dittler, R. u. Eisenmeier, J., Pflügers Arch., **126**, 610. 1909 — 14 Wezler, K., Ber. ü. d. ges. Physiol. u. exp. Pharm., **135**, 461. 1949 — 15 Fischer, M. H. u. Wodak, E., Ztschr. f. Hals-, Nasen- und Ohrenheilk. **3**, 198. 1922

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Tübingen

Konstruktion und Empfindlichkeitsanalyse eines Dynamometers nach dem Prinzip von Wöhlisch

Von Gerhard Josenhans

Mit 2 Abbildungen

Eingegangen am 18. Mai 1949

I.

Seit der Entdeckung der thermokinetischen Elastizität durch *Wöhlisch*¹ und besonders seit ihrer Erklärung aus dem Molekülaufbau gewisser hochpolymerer Stoffe aus Fadenmolekülen durch *K. H. Meyer*² hat die Messung des thermischen Spannungs- und Längenkoeffizienten sehr an Interesse gewonnen. Denn die zunächst rein thermodynamische Formel von *Wiegand* und *Snyder* gestattet seitdem über den Freiheitsgrad von Fadenmolekeln kolloider Substanzen quantitative Aussagen zu machen.

Um zu entscheiden, wie weit an elastischen Kräften die Knäuelung von Fadenmolekülen oder aber Kohäsionskräfte beteiligt sind, ist die Kenntnis der jeweiligen Änderung der elast. Spannung mit der Temperatur notwendig. Der erste Versuch, diese Änderung am Muskel zu bestimmen, wurde von *K. H. Meyer*³ gemacht — unter Verwendung des Polanyischen Dynamometers, das für solche Zwecke wenig geeignet erscheint. Zur Nachprüfung der *Meyerschen* Ergebnisse konstruierte *Wöhlisch*⁴ ein Spezialdynamo-Dilatometer unter möglichster Ausschaltung aller denkbaren Fehlerquellen.

Da aber eine Analyse darüber bis jetzt fehlt, wieweit diese Ausschaltung möglich ist, besteht ein Bedürfnis, dies nachzuholen. Gleichzeitig empfahlen sich einige Änderungen an dem Apparat von *Wöhlisch*.

II.

Die Konstruktion des Apparates geht aus Abb. 1 hervor. Sie unterscheidet sich von dem Apparat von *Wöhlisch* im wesentlichen in 3 Punkten:

1. Der Hebelarm, der der Spannungsanzeige dient, ist zu einem System zweier Hebel erweitert.

2. Die Quarzplatte fehlt, die das gedehnte Objekt zur Vermeidung des „Auftriebfehlers“ unterstützt.

3. Die Rasierklinge ist nur an einem Ende als federnder 1-armiger Hebel befestigt, während Wöhlisch sie an beiden Enden festgeklemmt hat, so daß der Ausschlag des Dynamometerarms zu einer Torsion der Klinge führt. Bei zweiseitiger Befestigung sind die elastischen Gegenkräfte der Feder viel stärker und infolgedessen der Ausschlag des Hebels wesentlich kleiner.

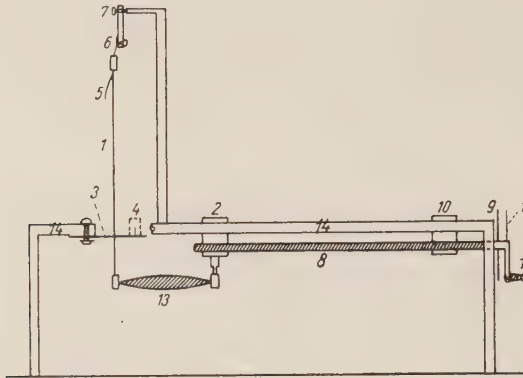


Abb. 1. Dynamo-Dilatometer. 1. Dynamometerarm mit Muskelklemme und festgelegtem Stahlrädchen, 2. Dilatometerarm mit Muskelklemme und Hartgummiisolierung, 3. Rasierklinge mit Befestigungsschraube, 4. Zusatzgewicht mit Befestigungsdorn im hinteren Loch der Klinge, 5. Glimmerspiegelhebelchen mit Spiegel, 6. Halter für den Spiegelträger mit Stellschraube zur Einstellung des 0-Punktes, 7. Empfindlichkeitsveränderung durch Heben und Senken des Spiegelträgers, 8. Dilatometerspindel, 9. Kreisscheibe zu 1/10 Längenablesung, 10. Lagerbock der Spindel, 11. Zeiger an der Spindel, 12. Spindelkurbel, 13. Versuchsobjekt, 14. zwei nebeneinander liegende Aluminiumschienen, an denen Spiegelauflauf, Rasierklinge und Dilatometerarm befestigt sind. Die durchgehenden Schienen sind neben der Rasierklinge unterbrochen gezeichnet, um den Blick auf die Rasierklinge und den Mittelteil des Dynamometerarms freizugeben.

Die Empfindlichkeitssteigerung bei einer einseitigen Befestigung kann allerdings Ursache folgenden Fehlers werden:

Die Rasierklinge wird durch das Gewicht des Dynamometerarms ein wenig abwärts gebogen, sie ist infolgedessen auch ohne Zug am Dynamometerarm — d. h. in Nullstellung — ein wenig gespannt. Da der Elastizitätsmodul von Rasierklingen temperaturabhängig ist, ändert sich die Nullstellung des Apparates dann mit der Temperatur, wenn der Dynamometerarm schwer ist im Verhältnis zur Stärke der Rasierklinge. Der Fehler ist leicht erkennbar und vermeidbar, weil er zu einer temperaturabhängigen Änderung des Nullpunkts auch dann führt, wenn gar nichts in den Apparat eingespannt ist.

Das Fehlen der Quarzplatte vermindert die Reibung, während der Auftriebsfehler keine Rolle spielt, wie die Analyse der Eigenschaften des Apparates (siehe unten) zeigt.

Der Zug der elastischen Substanz ändert den Anstellwinkel des Dynamometerarms — und zwar zweckmäßig um einen sehr kleinen Betrag, damit sich bei Spannungsänderungen der Substanz ihre Länge möglichst wenig ändert. Für die Ablesung aber ist es günstig, wenn die Winkeländerung des Dynamometerarms bzw. des Spiegels groß wird. Deshalb sitzt der Spiegel auf einem sehr kurzen 1-armigen Hebel, der durch einen langen

Dynamometerhebel bewegt wird. Bei dem hier verwendeten Verhältnis von 20—25 : 1 ergibt sich für kleine Winkeländerungen eine etwa 20-fache Vergrößerung des Winkels für den Spiegel und eine 40-fache für den Lichtstrahl — statt der einfachen Winkelverdopplung des Strahles bei *Wöhlisch*. Diese außerordentliche Steigerung der Empfindlichkeit führt nur dann nicht zum Auftreten neuer Fehler, wenn die Achse des kurzen Spiegelhebelchens sich reibungslos dreht und absolut unverschieblich gelagert ist. Uns hat sich eine dünne Spiegelachse bewährt, deren Spitzen in Stahlschrauben genau eingeschliffen waren, so daß sich der Druck der Achsenlager auf die Achse passend regulieren läßt. Ferner muß die Reibung an der Berührungsstelle beider Hebel sehr klein sein. Als Spiegelhebelchen wurde deshalb entweder ein Glimmerplättchen oder ein Achatplättchen verwendet. Die Übertragung der Bewegung des Dynamometerarms erfolgte auf das Achatplättchen durch eine Stahlspitze, auf das weniger harte Glimmerplättchen durch die Kante einer runden Stahlscheibe; die Scheibe ist mit vertikal stehenden Flächen so in das obere Ende des Dynamometerarms eingesetzt, daß das Glimmerplättchen auf ihren Rand tangential von oben herabhängt*.

III.

Die Eigenschaften des Dynamo-Dilatometers sind folgende: Bei Verwendung dünner Rasierklingen (∞ 80—100 μ) und einer Länge des Lichtarms von 4,50 m bedeutet eine Verschiebung um 0,5 cm eine Änderung der Spannung um 6—9 mg je nach den Eigenschaften der Rasierklinge. Dem entspricht eine Verkürzung der eingespannten Substanzprobe um 1 μ . Die größten beobachteten thermischen Spannungsänderungen betrugen etwa 350 mg, gleich einer Längenänderung von 44 μ . Bei Längen des Objekts von 30 000—40 000 μ (30—40 mm) erreicht demnach die maximale Längenänderung höchstens ein Promille der Ausgangslänge, d. h. die Isometrie ist praktisch gewahrt.

Das Dynamo-Dilatometer gibt nur die Horizontalkomponente der Gesamtspannung des horizontal eingespannten Objektes an. Diese Gesamtspannung kann dann — aber *nur* dann — größer sein als die Horizontalkomponente, wenn das untersuchte Objekt nicht mehr genau horizontal angreift, d. h. merklich durchhängt. Der Unterschied zwischen Gesamtspannung und Horizontalkomponente wird aber sehr klein, wenn die Dichte des Temperierbades und des Objekts annähernd gleich ist. Die Gesamtspannung ist das 1,4 ($\sqrt{2}$) fache der Horizontalkomponente, wenn der Muskel unter einem Winkel von 45° gegen die Horizontale am Dynamometerarm angreift. Dann würde bei einem spezifischen Gewicht von 1,052 und einem Muskelgewicht von 200 mg in Luft oder 14 mg im Bad die Gesamtspannung dicht am Auf-

* Der naheliegende Gedanke, die Stahlscheibe drehbar zu machen, um die Reibung noch mehr zu vermindern, bewährt sich nicht, denn es ist unmöglich, ein so kleines Rädchen völlig genau auf der Achse zu zentrieren. Geschieht das aber nicht, so hängt der empfindliche Ausschlag des Spiegelhebels nicht allein von der Stellung des Dynamometerarms ab, sondern auch von der jeweiligen Stellung des Rädchens. Auf der anderen Seite ist eine weitere derartige Minderung der Reibung überflüssig.

hängepunkt 9,8 mg betragen, während die horizontale wie vertikale Komponente 7 mg betrüge. Die Differenz von 2,8 mg liegt bereits unter der Anzeigeempfindlichkeit des Instrumentes.

Erst recht unter der Anzeigeempfindlichkeit des Instrumentes liegt der Einfluß des Gewichtes des Objekts, den *Wöhlisch*⁵ als Auftriebsfeder diskutiert: Da im allgemeinen der thermische Ausdehnungskoeffizient von Bad und Objekt nicht genau gleich ist, wird das scheinbare Gewicht des Objekts bei einer Temperaturänderung ein wenig kleiner oder größer. Bei einem Froschmuskel von 200 mg Gewicht und einer Temperaturänderung von 10 ° C beträgt diese scheinbare Gewichtsänderung in Ringerlösung nur etwa 0,14 mg (spezifisches Gewicht des Muskels bei 20 ° C 1,05111, bei 10 ° C 1,05204). Also ist eine Unterstützung durch eine Quarzplatte (siehe oben) nicht nötig.

Der wichtigste systematische Fehler ist der sog. Interferenzfehler. Er beruht darauf, daß bei Temperaturänderungen der Abstand der Befestigungspunkte des Objektes nicht konstant bleibt, weil auch die Längen der tragenden Metallteile des Apparates sich thermisch ändern. Um diesen Fehler zu vermeiden, sind (nach *Wöhlisch*) alle Metallteile, die mit ihrer Längsrichtung dem Muskel parallel liegen, außerhalb des Temperierbades angeordnet. Sie nehmen aber natürlich trotzdem — durch Leitung über den Dynamo- und Dilatometerhebel und durch Strahlung — abgeschwächt an den Temperaturänderungen des Bades teil. Die thermoelektrische Temperaturkontrolle ergab, daß bei reversibler Erwärmung des Bades um 12 ° C sich die Gleichgewichtstemperatur der einzelnen Metallteile um die Werte der Tabelle 1 änderte.

Tabelle 1

Temperaturänderungen der Metallteile des Apparates bei Erwärmung des Wassers von 12° C auf 24° C

	Apparatteile	Abgelesene Temperaturänderung
A	Aluminiumschiene, die Dilatometerarm und Rasierklinge trägt	2,45 ° C
B	Horizontaler Teil des Dilatometerarms (Aluminium) bei dem Modell der Abb. 1 weggelassen.	3,0 ° C
C	Rasierklinge	1,9 ° C
D	Oberer Horizontalbalken des Spiegelaufsatzes (Messing)	0,55 ° C
E	Unterer Horizontalbalken des Spiegelaufsatzes (Aluminium)	0,85 ° C

Die Längenänderungen durch Temperaturänderungen kompensieren sich weitgehend — für die Objektklemmen A gegen B + C und für den Ansatzpunkt des Spiegelhebels D gegen C. Es ergibt sich so für die Temperaturen der Tabelle und eine Objektlänge von 30 mm eine Änderung in der Entfernung der Ansatzpunkte von 2,4 μ und für die Verschiebung der Spiegelachse 3,5.10⁻² μ . Die Änderung der Objektspannung durch eine Längsände-

rung von $2,4 \mu$ ist bis herauf zu einem Elastizitätsmodul von 0,1 nicht sicher nachweisbar. Der Verschiebung der Spiegelachse entspricht ein Ausschlag des Lichtzeigers auf der 4,50 m entfernten Skala von 0,18 mm*.

Für die experimentelle Prüfung des Interferenzfehlers wurde ein etwa 40 mm langer, 0,4 mm dicker Platindraht eingespannt und der Dynamometerarm statt zur Messung der Spannungsänderung zur Messung der Längenänderung verwendet. Daß sich dabei dann auch die Spannung ändert, schadet bei dem hohen Elastizitätsmodul des Platins und der Geringfügigkeit der Spannungsänderung nicht. Der gefundene Ausschlag entsprach einem linearen thermischen Ausdehnungskoeffizienten des Platins von $8,5 \times 10^{-6}$ statt 9×10^{-6} , war also nicht durch einen Interferenzfehler entsteht.

Tabelle 2

Die Konstanz des Nullpunktes bei Belastung und Entlastung

Belastung in mg	50	100	200	500	1000	2000	3000
Zahl der Versuche	20	20	20	20	20	20	20
Durchschnittswert der Anzeige in Skalenteilen	2	5	10	25	49	100	160
Durchschn. Fehler der Einzelablesung in Skalenteilen	0	0,1	0,2	0,125	0,3	0,7	1,1
Maxim. Fehler der Einzelablesung in Skalenteilen	0	0,5	0,5	0,5	0,5	1,5	2
Prozentualer Anzeigefehler	0	2	2	0,4	0,2	0,8	0,6
0-Pkts.-Fehler durchschnittlich in Skalenteilen	0	0,1	0,125	0,075	0,7	0,275	0,35
0-Pkts.-Fehler maximal in Skalenteilen	0	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1

Der Apparat in dieser Konstruktion zeigt also keine systematischen Fehler, die auch nur von fern an die Empfindlichkeitsgrenzen heranreichen.

Daß auch die zufälligen Fehler klein sind, geht aus Tabelle 2 und noch überzeugender aus Abb. 2 hervor. Drei von einander unabhängige Versuche mit demselben Gummifaden, zu verschiedenen Zeiten (jedes Mal mit neuer

Einspannung) ergaben für β wie für $\frac{\delta k}{\delta T}$ die gleichen Kurven. Die Differenzen der einzelnen Versuchspunkte der $\frac{\delta K}{\delta T}$ Kurve überschritten 2 mg nicht. Da die gemessene Temperaturdifferenz ΔT nicht 1 sondern 10^0 C betrug, sind also die Messungen innerhalb einer Streubreite von 20 mg reproduzierbar.

Infolge seiner hohen Empfindlichkeit können mit dem Apparat nur Spannungen von 100—500 mg gemessen werden. Höhere lassen sich messen, indem in das Loch in der freien Kante der Klinge ein kleiner Zapfen einge-

* Nach der Näherungsformel $x = \frac{2 \Delta L \cdot d}{r}$ wobei ΔL die Verschiebung der Spiegelachse, r die Länge des Spiegelhebels und d die Länge des Lichtzeigers ist.

schraubt wird, auf den sich zylinderförmige Metallröhren aufsetzen lassen. Die Empfindlichkeit des Apparats wird dadurch bis zu 15 g nicht verändert, nur der Meßbereich verschoben.

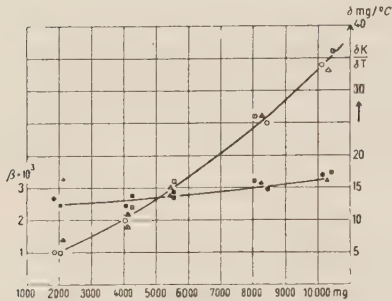


Abb. 2. Spannungsänderungen eines Gummifadens in Abhängigkeit von der Temperatur und der vorgegebenen Spannung. Abszisse: Vorgegebene Spannung in mg. Ordinate links: Linearer Spannungskoeffizient $\beta \times 10^{-3} = \frac{1}{K} \times \frac{\delta K}{\delta T}$

Ordinate rechts: $\frac{\delta K}{\delta T}$ in mg.

Temperaturintervall zwischen 299 und 309° abs.

Versuch 1

Versuch 2

Versuch 3

Die gefüllten Symbole gehören zur -Kurve, die umrandeten Symbole gehören zur Kurve $\frac{\delta K}{\delta T}$. Die drei Versuchsreihen sind unter gleichen Bedingungen gemessen; doch wurde der Gummifaden zu jeder Versuchsreihe neu eingespannt.

Zusammenfassung: Es werden einige Modifikationen am Typus des Wöhlischen Dynamo-Dilatometers angegeben, und es werden die Empfindlichkeitsgrenzen und Fehler solcher Typen von Apparaten quantitativ analysiert.

Bei der Fehleranalyse zeigt sich, daß die Fehler, die auf dem Eigengewicht des Objekts beruhen, darunter auch der sog. Auftriebsfehler Wöhlischs weit unter den Empfindlichkeitsgrenzen des Apparates bleiben, falls die Dichte von Objekt und Temperierbad einigermaßen ähnlich ist (z. B. zwischen 1 bis 1,06 zu 1). Das Gleiche gilt für den sog. „Interferenzfehler“, obwohl die außerhalb des Bades liegenden Metallteile nicht unbeträchtlich an den Temperaturänderungen teilnehmen (thermoelektrische Messungen).

Infolgedessen bedarf das Objekt keiner Unterstützung durch eine Quarzplatte. Nachdem deren Reibung wegfällt, wird die Empfindlichkeit des Apparates etwa 20 fach gesteigert, dadurch, daß der Dy-

namohebel zu einem System zweier Hebel erweitert wird. Die Empfindlichkeitsgrenze liegt dann bei Gesamtspannungen bis zu 10 g bei Spannungsunterschieden von 8 mg. Die Längenänderungen des Objekts infolge des Ausschlags des Dynamometerarms betragen dann maximal 40–45 μ , in der Regel ca. 15 μ . Sie erreichen also bei einer Objektlänge von 40 mm nur in Extremfällen das Verhältnis von 1/1000.

Die Genauigkeit der Bestimmung der Längenänderungen hängt von der Güte der Dilatometerspindel ab. Bei dem vorliegenden Apparat war sie infolge zeitbedingter Materialschwierigkeiten nur auf etwa 0,2 mm genau.

Für die Anregung und Beratung bei dieser Arbeit bin ich Herrn Professor Hans H. Weber zu warmem Dank verpflichtet, Fräulein Annemarie Weber danke ich Versuche und Kurve der Abb. 2.

Literatur

- 1 Wöhlisch, E., Verh. physik.-med. Ges. Würzburg, N.F., 51, 53 (1926) —
- 2 Meyer, K. H., v. Susich u. Walko, Kolloid Z. 59, 203 (1932) — 3 Meyer, K. H. u. L. E. R. Picken, Proc. Soc. Send. — 4 Wöhlisch, E., Kolloid-Zschr. 100, 151 (1942) — 5 Wöhlisch, E. u. H. G. Clamann, Z. Biol. 91, 399 (1931)

Aus dem Physiologischen Institut Tübingen

Der thermokinetische und potentielle Anteil der Elastizität des Froschmuskels

Von Wilhelm Josenhans

Mit 5 Abbildungen

Eingegangen am 18. Mai 1949

I.

Es erscheint lohnend zu wissen, wieweit die elastischen Kräfte des Skelettmuskels thermokinetischer Art sind, und wieweit sie es nicht sind. Denn hieraus lassen sich Schlüsse ziehen, wieweit die Strukturen des Muskels aus frei beweglichen Fadenmolekülen bestehen, und wieweit sie durch gerichtete Kohäsionskräfte in ganz bestimmten Formen und Anordnungen festgelegt sind. Diese Frage hat *K. H. Meyer* und *Picken*¹ bei dem ersten Versuch einer derartigen Analyse bewegt.

Außerdem hat das Auftreten thermokinetischer Phänomene am ruhenden Muskel *E. Wöhlisch*² veranlaßt, auch die Kontraktion als ein thermoelastisches Phänomen anzusehen, das dann stattfindet, wenn gewisse unbekannte Sperrmechanismen durch die Erregung des Muskels aufgehoben werden.

Die Analyse der Muskelelastizität auf Beteiligung thermokinetischer Kräfte durch *Meyer* und *Picken*¹ einerseits, durch *Wöhlisch* und *Grüning*³ andererseits hat zu widersprechenden Ergebnissen geführt — besonders für das Gebiet geringer Dehnung, bzw. geringer elastischer Kräfte. Hier finden *Meyer* und *Picken*¹ Normelastizität*, während *Wöhlisch* und *Grüning*³ nichtideale Thermoelastizität* angeben. Es scheint also lohnend, diese Frage mit verbesserter Methodik zu prüfen.

II.

Unsere Analyse des Dynamo-Dilatometer vom *Wöhlisch*-Typ hat gezeigt (vgl. vorige Mitteilung), daß dieser Typ von systematischen Fehlern praktisch frei ist. Sie hat ferner gezeigt, daß der Apparat so empfindlich gemacht werden kann, daß Spannungsänderungen von 10^{-3} damit gemessen werden können.

* Es wird in dieser Arbeit die praktische Nomenklatur von *Wöhlisch* angewandt; vgl. z. B. *Wöhlisch* u. *Grüning*³

Berücksichtigt man, daß die Spannungsänderung bei idealer thermokinetischer Elastizität $1/273$ beträgt, daß man aber zur Bestimmung im allgemeinen einen Temperaturintervall von 10°C benützt, so beträgt die Empfindlichkeitsschwelle des Apparats etwa den 30. Teil des zu messenden Ausschlags. Tab. 1 zeigt, daß sie damit weit unter den individuellen Schwankungen des elastischen Verhaltens symmetrischer Froschmuskeln vom r. und l. Bein liegt. Es zeigt sich, daß der thermische Spannungskoeffizient β bei gleichzeitiger Messung in 2 verschiedenen Dynamo-Dilatometern und praktisch gleicher Spannung durchaus verschieden ist. Diese Verschiedenheit aber bleibt erhalten, und die absoluten Werte von β bleiben praktisch dieselben, wenn Muskel und Dilatometer über Kreuz ausgetauscht werden.

Tabelle 1
Vergleich symmetrischer Muskeln

	$\beta \times 10^{-3}$		bei einer Gesamtspannung (mg/mm ²) von Semimembranaceus	
	links	rechts	links	rechts
Apparat I	5,95	7,45	49,5	41,0
Apparat II	6,6	7,7	38,5	43,0

Die starke Streuung in den Versuchergebnissen* beruht also nicht auf zufälligen oder systematischen Fehlern der Apparatur, sondern auf realen Unterschieden im inneren Zustand der Muskelstruktur. Hieraus folgt zweierlei: Erstens, um eine Aussage über den „normalen“ inneren Zustand des Muskels zu gewinnen, sind Mittelwerte aus einer großen Versuchszahl an einzelnen Muskeln zu gewinnen. Zweitens ergibt sich daraus die Forderung, zu bestimmen, welche unabhängigen Variabeln die Variabilität des elastischen Verhaltens bedingen.

Die elastische Kraft hängt außer vom inneren Zustand des Objekts nur noch von seinem Querschnitt und dem Dehnungsgrad, nicht aber von der Länge ab. Man kann also die Ergebnisse von vielen Muskeln dann vergleichbar machen, wenn man die Kräfte der „elastischen Zustandsgleichung“⁵ immer auf den gleichen Querschnitt von 1 qmm reduziert. Das geschieht durch Division mit dem Querschnitt Q. Die Zustandsgleichung wird so umdimensioniert von einer Kraft- zu einer Zuggleichung

$$\frac{K}{Q} = \frac{\left(\frac{\partial U}{\partial L}\right)_T - \left(\frac{\partial K}{\partial T}\right)_L}{Q} \cdot T$$

Wöhlisch hat sich ebenfalls um eine allgemein vergleichbare Größe bemüht — und zwar durch Bildung seines thermischen Spannungskoeffizienten

* Auch von Wöhlisch u. Grüning beobachtet, briefliche Mitteilung.

$\beta = \frac{1}{K} \cdot \left(\frac{\delta K}{\delta T} \right) L$. Diese dimensionslose Zahl ist aber als solche für eine weitere thermodynamische Analyse unfruchtbar; außer wenn sie durch Multiplikation mit $\frac{K \cdot T}{Q}$ schließlich doch in die thermokinetische Zugkraft verwandelt wird.

Die Allgemeingültigkeit der elastischen Zuggleichung hat folgenden weiteren Vorteil: Zur thermodynamischen Analyse jedes Punktes der Dehnungs- oder Spannungskurve kann ein frischer Muskel verwendet werden. Hierdurch wird für den Einzelversuch Zeit gewonnen, die gestattet, vor Versuchsbeginn die elastische Nachwirkung vollständig abzuwarten, und während des Versuchs auf vollständigen Temperatúrausgleich zwischen den inneren Teilen des Muskels und dem Temperierbad zu achten.

Die Wartezeit auf das Abklingen der elastischen Nachwirkung betrug bei niedrigen Spannungen nie unter 1 Stunde, bei hohen Dehnungen bis zu 14 Stunden bei 0° C. Bei Temperaturdifferenzen zwischen „warm“ und „kalt“ von 12° C (13–25° C) und einer Dauer der Temperaturänderung von 5 Min. war der Temperatúrausgleich beendet, wenn 5–10 Min. auf der Extremtemperatur verharret wurde. Abb. 1 zeigt die Geringfügigkeit der Nachdehnung bei kleiner, Abb. 1 a bei großer Spannung. Als Versuchsmuskel wurde der *M. rect. fem. major seu semimembranaceus* von *R. esc.* verwendet. Er ist besonders arm an Bindegewebe, und er hat auch bei verhältnismäßig kleinen und abgemagerten Fröschen einen einigermaßen beträchtlichen Querschnitt und ist dabei genügend parallelfaserig. Die bedeckende Fascie des Muskels wurde abpräpariert, der mittlere Querschnitt des Muskels ergibt sich aus Gewicht und Länge. Nach Beendigung des Versuches wurde die Erregbarkeit des Muskels geprüft, es wurden immer Versuche verwendet, bei denen die Muskeln voll erregbar waren. Doch wurden Schwellenwert und Spannung vor und nach dem Versuch nicht quantitativ bestimmt.

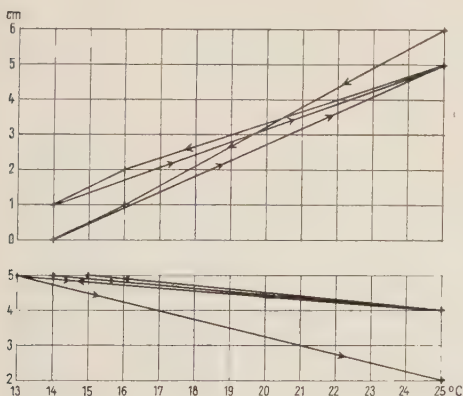


Abb. 1 und 1 a. Elastische Spannung und Temperatur. Abszisse: Temperatur in Celsius. Ordinate: Spannung in Skalenteilen; Intervall der Ablesungen 5'. Die Pfeile geben die Reihenfolge der Ablesungen an; die Höhendifferenz zwischen den frühen und späten Punkten der gleichen Temperatur beruht auf Streuung, nicht auf Nachdehnung.

Abb. 1 Gesamtspannung 50 mg/mm²

Abb. 1 a Gesamtspannung 1750 mg/mm²

III.

Sollen die thermoelastischen und potentiellen Zugkräfte den verschiedenen Spannungen eines Spannungs - Längen - Diagramms richtig zugeordnet werden, so müssen nicht nur die thermisch bedingten Spannungsänderungen, sondern auch die absoluten Spannungen genau bekannt sein, die auf der jeweiligen Dehnung des Muskels beruhen. Die Absolutspannung kann aus dem Ausschlag des Lichthebels nur dann richtig abgelesen werden, wenn genau bekannt ist, welcher Skalenstrich bei *eingespanntem* Muskel der *Spannung 0* entspricht. Also wird der Muskel nach Beendigung des

Versuches dicht am Dynamometerarm durchgeschnitten, wodurch der Dynamometerarm in die 0-Stellung zurückkehrt. Wird der Muskel vorsichtig ein-

gespannt, so stimmt der 0-Punkt am Schluß mit dem 0-Punkt vor Einspannen des Muskels ohne systematischen Fehler überein. Der durchschnittliche Fehler betrug 0,225 Skalenteile (40 Versuche).

Die elastische Zustandsgleichung in der hier angewandten Form

$$\frac{K}{Q} = \frac{\left(\frac{\partial U}{\partial L}\right)_T}{Q} + \frac{\left(\frac{\partial K}{\partial T}\right)_L}{Q} \cdot T \quad \text{legt es nahe, die thermokinetische Zugkraft} =$$

$$\left(\frac{\partial K}{\partial T}\right)_L \cdot \frac{T}{Q} \quad \text{und die potentielle Zugkraft} \quad \left(\frac{\partial U}{\partial L}\right)_T \cdot \frac{1}{Q}$$

als Funktion des Gesamtzuges K/Q

darzustellen. Auf der anderen Seite war es bisher üblich, das nicht zu tun, sondern als unabhängige Variable den Dehnungszustand $\frac{\Delta L}{L}$ zu wählen,

der seinerseits K/Q über das Spannungslängendiagramm bestimmt. Diese Darstellung ist anschaulicher, und beide Arten laufen auf dasselbe hinaus, falls eine bestimmte Art von Muskeln immer dasselbe Spannungslängendiagramm besitzt — bezogen auf die Querschnittseinheit. Das aber ist nicht der Fall (vgl. Abb. 2). Es wurde nicht untersucht, worauf die Unterschiede

beruhen. Auf jeden Fall aber führt diese Zuordnung verschiedenen großer Spannungen zu gleicher Dehnung zu der Frage, ob das Verhältnis der thermokinetischen zu der potentiellen Zugkraft von der vorgegebenen Dehnung oder der vorgegebenen Spannung abhängt. Die Antwort auf diese Frage setzt den Vergleich der thermodynamischen Analyse als Funktion der Spannung mit derselben Analyse als Funktion der Dehnung voraus. Die Entscheidung fällt dann zu Gunsten der Abhängigkeit (Dehnung resp. Spannung), bei der die Ergebnisse weniger streuen. Für diesen Vergleich ist das Dynamometer nicht sehr geeignet, da es die Spannung sehr viel zuverlässiger und empfindlicher registriert als die Länge.

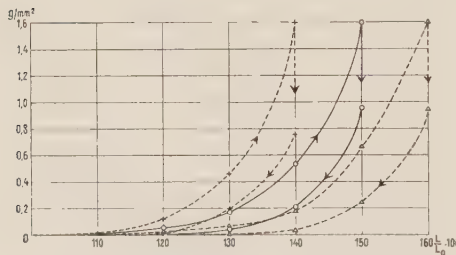


Abb. 2. Spannungslängendiagramm des Musculus semimembranaceus (rana esc.). — Mittelwertskurve aus 10 Versuchen. - - - Diagramm mit dem höchsten und mit dem niedrigsten Elastizitätsmodul von 10 Versuchen. Abszisse: relative Länge in % = $L/L_0 \times 100$. Ordinate: g/mm².

Zunächst besteht immer eine gewisse Unsicherheit bezüglich des 0-Punktes der Dehnung: Die Dehnung 0 entspricht theoretisch der Spannung 0, da aber der Muskel ein wenig schwerer ist als das Bad, tritt die Spannung 0 erst auf, wenn der Muskel ein wenig durchhängt, d. h., wenn der gemessene Abstand der Befestigungspunkte ein wenig kleiner ist als die wahre Muskellänge. Wird aber der Muskel so eingespannt, daß er völlig gestreckt ist (nach Augenschein), so tritt eine kleine Spannung auf von ca. 30 mg. Dieser Spannung aber entspricht natürlich auch eine gewisse, sehr kleine Dehnung, die aber verschieden ist für Muskeln von verschiedener Dicke. Zu dieser unvermeidbaren Unsicherheit kommt in den vorliegenden Versuchen noch eine nicht unbeträchtliche vermeidbare Ungenauigkeit. Sie beruhte darauf, daß bei der primitiveren Form des Apparats

der Dilatometerarm einen gewissen toten Gang hatte, der Differenzen von ca. 1 mm zwischen der abgelesenen und der tatsächlichen Länge erlaubte. Die Zahl der Versuche mit dem zweiten Apparat war zu klein, um einen Vergleich der Spannungsabhängigkeit mit der Dehnungsabhängigkeit der thermoanalytischen Ergebnisse zu gestatten. Aus diesem Grunde ist die Darstellung der Spannungsabhängigkeit einwandfreier als die Abhängigkeit von der Dehnung.

IV.

Bildet man aus den experimentellen Einzelergebnissen eine Kurve der Wöhlischschen β -Werte als Funktion der Spannung/mm² von 0 bis ca. 3000 mg/qmm, so erhält man die Kurve der Abbildung 3. Die Kurve zeigt,

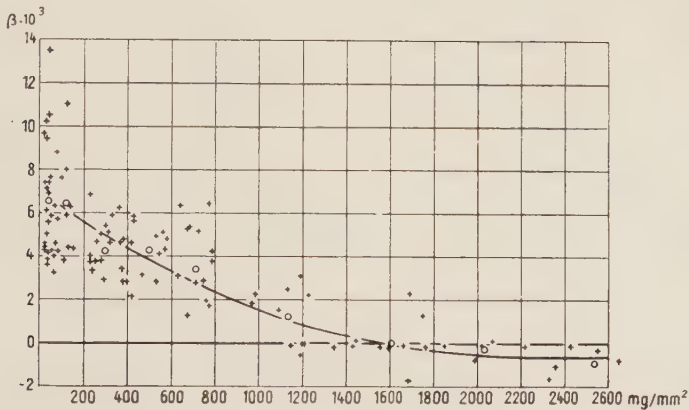


Abb. 3. Thermischer Spannungskoeffizient als Funktion der Spannung. Abszisse: Spannung/mm² = mg/mm². Ordinate: $\beta \cdot 10^3$. + = Versuchspunkte, senkrechte Linien = Abgrenzungen der Felder, in denen die Versuchspunkte gruppenweise gemittelt sind; o = Mittelwert der einzelnen Gruppen.

daß der *M. rect. fem. major* von *R. esc.* bei einer Spannung > 1600 mg/mm² normelastisches bzw. nichtideal normelastisches Verhalten zeigt; bei einer Querschnittsbelastung von 1600 mg/mm² liegt der Wöhlischsche Inversionspunkt. Von hier bis zur Spannung 0 zeigen steigende β -Werte thermoelastisch anormales Verhalten an. Die Ergebnisse stehen nicht im Einklang mit der Angabe von Meyer und Picken¹, daß bei sehr niederen Dehnungen das Verhalten des Muskels wieder normalelastisch würde. Dagegen bestätigen und erweitern sie die entgegengesetzte Angabe von Wöhlisch und Renk⁵, die auch für Dehnungen = 0 einen anormalen linearen thermischen Ausdehnungskoeffizienten α gefunden haben.

Werden die β -Werte als Funktion der Dehnung dargestellt, so ergibt sich die Kurve der Abbildung 4. Die β -Kurve schneidet die 0-Linie bei einer Dehnung von 43–44 % und bestätigt damit für den *M. rect. fem. major* die Beobachtung von Wöhlisch und Grüning³ nach der beim Sartorius der Inversionspunkt bei ca. 44 % Dehnung liegt. Die Streuung der Versuchspunkte und auch der Gruppenmittelwerte ist viel größer als in Abbildung 3. Das könnte so aussehen, als hinge das thermoelastische Verhalten weniger von der Dehnung als von der Spannung ab. Doch ist dieser Schluß in seiner Sicherheit sehr eingeschränkt durch die oben geschilderten Unsicherheiten bei der Bestimmung der Dehnung.

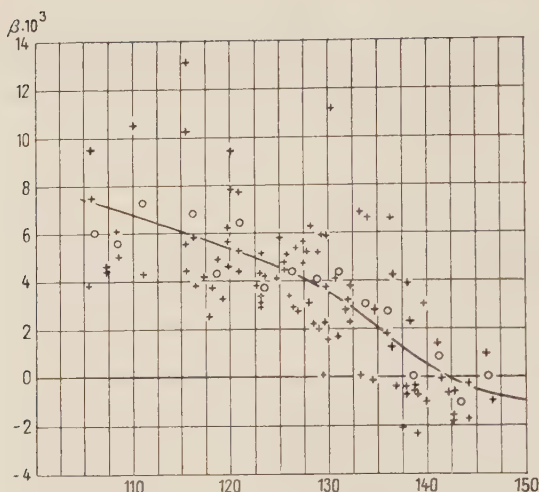


Abb. 4. Thermischer Spannungsbeizkoeffizient als Funktion der Dehnung. Abszisse: Verlängerung ($L/L_0 \cdot 100$). Ordinate: $\beta \cdot 10^3$. + = Versuchspunkte; senkrechte Linien = Abgrenzung der Felder, in denen die Versuchspunkte gruppenweise gemittelt sind; o = Mittelwerte der einzelnen Gruppen.

V.

Rechnet man diese β -Werte durch Multiplikation mit $K \times T/Q$ (siehe oben) in die thermokinetische Zugkraft eines Muskels von 1 qmm Querschnitt um, so erhält man die Kurve 2 der Abbildung 5. Die Differenz dieser Komponente der Zugkraft gegen die Gesamtzugkraft K/Q gibt den Teil der Zugkraft, der auf chemisch-potentiellen Kräften beruht (Kurve 3 der Abbildung 5). Kurve 1 ist die Gesamtzugkraft als arithmetische Summe der beiden Komponenten.

Die thermodynamische Analyse bestätigt und erweitert die Befunde von

Wöhlisch und Grüning: Zwischen einer Spannung von 1600 mg/mm² und 700 mg/mm² beruht der elastische Muskelzug auf thermokinetischen und Kohäsionskräften nebeneinander. Von da an abwärts bis zur Spannung 0 beruht er nur noch auf thermokinetischen Kräften, während die Kohäsionskräfte sich bemühen, den Muskel zu strecken. Falls also die Länge des Muskels allein durch die Kohäsionskräfte bestimmt wäre, würde er in völlig entspanntem Zustand die Länge besitzen, die er infolge des Vorhandenseins der thermoelastischen Kräfte erst bei einer Spannung von 700 mg/mm² annimmt. Mit der Annäherung an die Spannung 0 nehmen die thermoelastischen Zugkräfte soweit ab, daß sie beim Nullpunkt der Spannung durch die streckenden Kräfte der Kohäsion gerade kompensiert werden.

Die Bestimmung der beiden Komponenten der Zugkraft wird mit der Annäherung an die Gesamtzugkraft 0 verhältnismäßig unsicher. Außerdem ist eine Extrapolation notwendig, weil man die thermische Änderung der Zugkraft nur solange bestimmen kann, wie eine Zugkraft überhaupt vorhanden ist. Infolgedessen sind die niedrigsten Zugkräfte, die in einzelnen wenigen Versuchen erreicht wurden, = 20 mg/mm². Der letzte Gruppenmittelwert liegt bei 85 mg/mm², extrapoliert man von ihm auf 0, so ergibt sich für die kinetische Zugkraft ≈ 50 mg/mm² und für die potentielle entsprechend ≈ -50 mg/mm². Extrapoliert man von den höchsten und niedrigsten Einzelversuchen aus, so ergeben sich Werte, die zwischen 0 und 240 mg/mm² streuen. Infolge dieser Streuung kann nicht mit Sicherheit entschieden werden, ob mit der Annäherung an die Spannung 0 außer den thermokinetischen Zugkräften auch die Streckkräfte der Kohäsion wieder

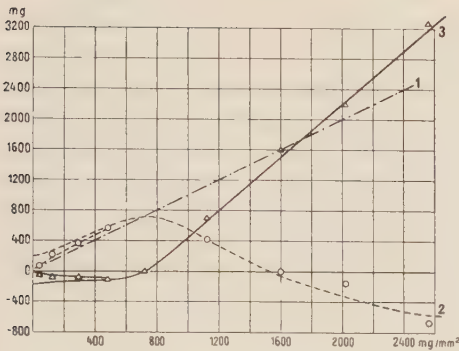


Abb. 5. Thermoelastischer und potentieller Anteil des elastischen Muskelzuges. Ordinate: Zug in mg/mm^2 . Abszisse: Spannung/ mm^2 . Strichpunktierte Kurve 1 = Gesamtzug; gestrichelte Kurve 2 thermokinetischer Zug; ausgezogene Kurve 3 = chemisch-potentieller Zug. Die Aufspaltung der Kurven 2 und 3 bei Spannungen kleiner als 400 mg/mm^2 gibt die oberen und unteren Grenzen der Zugspannung an, die nach den Untersuchungsergebnissen noch möglich sind. o Gruppenmittelwerte des thermokinetischen Zuges, I Gruppenmittelwerte des potentiellen Zuges (Gruppenbildung nach Abb. 3).

abnehmen. Im unkomplizierten Fall sollte man eher eine Zunahme erwarten, weil sich die Spannung immer mehr von der Spannung 700 mg/mm^2 , d. h. vom Nullpunkt der Kohäsionskräfte entfernt. Aber die Elastizität des Muskels ist nicht unkompliziert. Das ergibt sich daraus, daß die thermokinetischen Kräfte bei großen Spannungen wieder verschwinden, statt weiter zuzunehmen. Denn für die thermokinetische Zugkraft bedeutet wachsende Spannung wachsende Entfernung aus der Gleichgewichtslage. Die Interpretation solcher Kompliziertheiten bedarf begründeter Modellverstellungen, die die reine Thermodynamik nicht liefert.

Dagegen liefert sie einige Zahlen zur Beurteilung der thermo-

kinetischen Entspannungshypothese der aktiven Muskelkontraktion².

Auch im ruhenden, völlig entspannten Muskel ist eine thermoelastische Zugkraft von 50 bis höchstens 250 mg/mm^2 vorhanden, die in ihrer Auswirkung durch die Streckkraft der Kohäsionskräfte gehemmt oder gesperrt ist. Es sind also die beiden Mechanismen im ruhenden Muskel tatsächlich vorhanden, die die Entspannungshypothese braucht. Würden im Kontraktionsmoment die sperrenden Kohäsionskräfte aufgehoben, so müßte eine Kontraktion durch die thermokinetischen elastischen Kräfte auftreten. Aber diese Kontraktion könnte eine Zugkraft $\infty 50 \text{ mg/mm}^2$ bis höchstens 250 mg/mm^2 nicht überschreiten. Der absolute Muskelzug von Froschmuskeln beträgt aber ungefähr das 100 fache.

Stellt man die thermoelastische und die potentielle Komponente der elastischen Kraft als Funktion der Dehnung und nicht der Spannung dar, so ergibt sich der 0-Punkt der potentiellen Kräfte beim *M. rect. fem. major* bei 30 % Dehnung*. Beim Sartorius liegt er nach Wöhlisch und Grüning^{3*} bei 20 %. In Anbetracht der großen Variabilität des Spannungslängendiagramms genügt die Übereinstimmung.

Zusammenfassung

Mit dem modifizierten Dynamo-Dilatometer nach Wöhlisch erweist sich eine thermodynamische Analyse der Muskelelastizität bis herunter zur Spannung 0 als möglich.

* Die Darstellung beruht auf der Umrechnung der Kurve der Abb. 3 mit Hilfe der Mittelwerte des Spannungslängendiagramms der Abb. 2. Die Darstellung ist infolgedessen nicht streng.

Es werden die thermokinetischen und die Kohäsionskomponente des elastischen Zuges für den *M. rectus femoris major seu semimembraneus* nach Versuchen an 99 Muskeln angegeben.

Bei der Spannung 0 werden thermokinetische Zugkräfte ähnlich 50 mg/mm² von gleichen Streckkräften der Kohäsion kompensiert oder „gesperrt“. Die Aufhebung dieser Sperrung würde eine thermokinetische Kontraktion mit einer Spannung ∞ 50 mg/mm² erwirken. Der absolute Muskelzug der aktiven Kontraktion ist über 100 mal größer.

Für die Anregung und Beratung zu dieser Arbeit bin ich Herrn Professor Hans H. Weber zu warmem Dank verpflichtet.

Literatur

- 1 K. H. Meyer u. Picken, Proc. Roy. Soc. London, B 124, S. 29 (1937) —
2 E. Wöhlisch, Naturw. Bd. 28 (1940), S. 305 — 3 E. Wöhlisch u. Grüning, Pflügers Arch. Bd. 246, S. 469 (1943) — 4 Wiegand-Snyder, Trans. Inst. Rubber Ind. 10, S. 234 (1934) u. L. Picken u. K. H. Meyer, Proc. Roy. Soc., London, B 124, S. 29, sowie Wöhlisch u. Grüning, Pflügers Arch. 246, S. 469 (1943) — 5 Wöhlisch u. Renk, Pflügers Arch. Bd. 243, S. 110 (1940)

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Tübingen

Über biologische Wirkungen extremer Acetylcholinverdünnungen

Von *K. Brecht* und *H. Kaumanns*

Mit 6 Abbildungen und 1 Tabelle

Eingegangen am 23. Mai 1949

Es ist der biologischen Forschung der neueren Zeit gelungen, die Grenzen nachweisbarer Substanzwirkungen in immer niedrigere Konzentrationsbereiche hinauszuschieben. Die Erforschung pflanzlicher Wirkstoffe hat gezeigt, daß diese noch in relativ hohen Verdünnungen wirksam sind. Durch Biotin, Aneurin und Auxin A konnten noch Wachstumseffekte mit Verdünnungen von 10^{-10} bis 10^{-12} hervorgerufen werden ^{1, 2, 3}. Eine hohe Wirksamkeit wurde bei den geschlechtsbestimmenden Carotinoiden gefunden. So hat das Safranal noch bei einer Konzentration von $5 \cdot 10^7$ Molekeln/ccm Androtermonwirkung auf Chlamydomonas-Zellen ⁴. Weiterhin läßt das Vitamin B₁₂ noch in Verdünnungen von $1,3 \cdot 10^{-11}$ g/ccm. Kulturflüssigkeit Wirkungen auf das Wachstum von *Bac. lactis* erkennen ⁵. Auch an tierischen Objekten konnten im Bereich höherer Verdünnungen biologisch aktiver Substanzen Reaktionen ausgelöst werden. So gelang es z. B. mit Hilfe des Blutegelpräparates (Rückenhautmuskel nach Fühner) oder mit dem Froschherz ⁶ Acetylcholinverdünnungen bis herab zu 10^{-9} und Adrenalinverdünnungen ebenfalls bis in diesen Bereich nachzuweisen. Wir selbst haben am Gefäßpräparat des Frosches nach Läwen-Trendelenburg unter günstigen Bedingungen noch Wirkungen (Gefäßverengerungen) von Acetylcholin-(ACh) Konzentrationen 10^{-9} bis 10^{-10} gesehen. Schließlich wurden an der isolierten Froschlunge Wirkungen von ACh (Kontraktion der glatten Lungenmuskulatur) bis zu Verdünnungen von 10^{-14} bis 10^{-16} erhalten ^{7, 8}.

Im weiteren Verlauf hat dann *Brecht* gezeigt ⁹, daß die künstlich durchströmte Froschlunge besonders empfindlich auf ACh sowohl mit Kontraktionen der Gefäße als auch ihrer glatten Muskulatur reagiert. *Lullies* ¹⁰ hat dies bestätigt und am Lungendurchströmungspräparat noch einwandfreie Wirkungen von ACh-Konzentrationen bis 10^{-17} erhalten.

Wir selbst haben nun mit teilweise neuer und verfeinerter Methode die Wirkungen extremer ACh-Verdünnungen am Lungendurchströmungspräparat noch einmal systematisch überprüft, um damit auch gleichzeitig die

überhaupt erreichbare Wirkungsgrenze festzustellen. Es ergab sich, daß unter optimalen Bedingungen noch Reaktionen durch größenordnungsmäßig tausend bis hundert Molekeln erreicht werden können. Dies ist offenbar nur dadurch möglich, daß das Lungendurchströmungspräparat eine Art gezielter Wirkung der ACh-Molekeln gestattet. Es muß betont werden, daß es sich hierbei immer um Wirkungen vorhandener Substanzmengen, mögen diese auch sehr gering sein, handelt. Unsere Befunde haben also mit den sog. „Potenzwirkungen“ nichts zu tun.

Methodik

Die Versuche wurden in der Zeit von Nov. 1948 bis April 1949 an *Rana temporaria* vorwiegend männlichen Geschlechtes durchgeführt. Nach Dekapitation der Tiere und Freilegen von Herz und Lunge wurde das umgebende Bindegewebe entfernt und beide Aortenstämme nahe am Bulbus unterbunden und bulbushwärts durchtrennt. Zur Sicherung einer isolierten Durchströmung der Lunge muß der Hautast der Arteria pulmo-cutanea aufgesucht und unterbunden werden. Nach Ligatur des Ösophagus wurde der Rumpf direkt unterhalb der Lungenhilusgegend durchtrennt und der Vorderkörper so auf ein Präparierbrett aufgespannt, daß die Durchströmungsflüssigkeit aus dem breit eröffneten Vorhof direkt in eine Ableitungsrinne fließen konnte. Die künstliche Durchströmung der Lunge erfolgte nach Einbinden einer Kanüle von der Art. pulmonalis aus. Eine Kammer aus feuchtem Filtrierkarton schützt das Präparat vor Austrocknung.

Die Durchströmung der Lunge wurde mit einer nach dem Venturiprinzip konstruierten Druckdifferentialstromuhr, ähnlich der von Fleisch¹¹ beschriebenen, bei langsamer Umdrehungsgeschwindigkeit optisch registriert. Aus einem großen Vorratsgefäß V mit seitlich angesetztem offenen Stutzen N (s. Abb. 1) fließt die

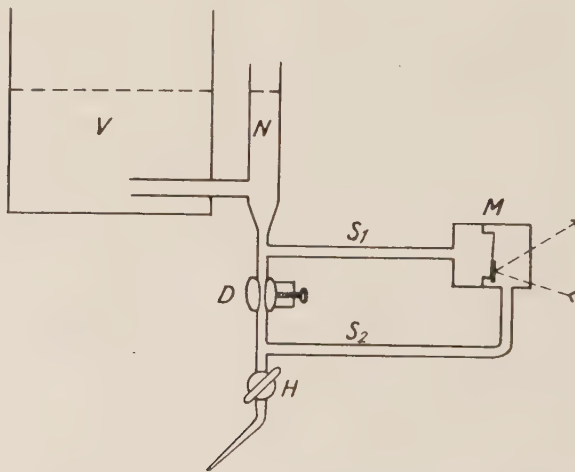


Abb. 1. Schema der Versuchsanordnung zur Registrierung der Durchströmung des Lungenpräparates (s. Text).

Durchströmungsflüssigkeit durch das System in die Kanüle. Der seitliche Stutzen N dient zum Einbringen des ACh; die Lösung wird aus einer Rekordspritze mit angesetzter langer Glaskanüle während des Versuches unmittelbar vor die Drossel D eingebracht. Dieses Vorgehen erweist sich als notwendig, um eventuelle durch die Injektion auftretende größere Druckschwankungen im System zu verhindern, da

dadurch sog. „Druckreflexe“, wie wir sie früher bereits beschrieben haben, ausgelöst werden können⁸. Kontrollen zeigten, daß bei Anwendung dieser Vorsichtsmaßregeln keine Druckreflexe in der Lunge auftreten.

Die Druckdifferentialstromuhr besteht aus einer regulierbaren Drossel D, die zwischen den Abgängen S_1 und S_2 zum Differentialmanometer liegt. Die Druckdifferenz zwischen S_1 und S_2 ist innerhalb eines bestimmten Bereiches linear proportional der Durchströmungsgeschwindigkeit, wie die Eichungen für bestimmte Drosselstellungen zeigen. Die Aufzeichnung der Druckdifferenz erfolgt optisch über eine Differentialkapsel M. Die Dimensionierung des Systems ist möglichst klein gehalten, um die Zeit von der Injektion der ACh-Lösung bis zum Eintritt in die Lunge weitgehend abzukürzen. Der Hahn H vor der Kanüle dient zum Verschließen des Systems vor und nach dem Versuch.

Bei einer Reihe von Versuchen registrierten wir gleichzeitig die Längenänderungen der Lunge. Um hierbei Reibung weitgehend auszuschalten und damit Entstellung der Kurven zu vermeiden, wurden die Längenänderungen der Lunge photoelektrisch aufgezeichnet¹².

Als Durchströmungsflüssigkeit diente eine gepufferte Ringerlösung (nach Barakan, Brömser und Hahn¹³), der bei den meisten Versuchen Nikotinsäureamid (NSA) in der Konzentration $1:10^4$ zugesetzt war.

Die Verdünnungen des ACh stellten wir so her, daß wir 100 mg Acetylcholinchlorid in 50 ccm destill. Wasser auflösten und davon 0,5 ccm in einen neuen Kolben mit 49,5 ccm destill. Wasser überpipettierten und so fort, so daß sich die Konzentrationen in den einzelnen Kolben verhielten wie $1:2 \cdot 10^3$, $1:2 \cdot 10^5$, $1:2 \cdot 10^7$ usw. Die so gewonnenen Verdünnungen werden mit $2 \cdot 10^{-3}$, $2 \cdot 10^{-5}$, $2 \cdot 10^{-7}$ usw. bezeichnet, d. h., 1 cm³ der betreffenden Verdünnungen enthält $2 \cdot 10^{-3}$ g, $2 \cdot 10^{-5}$ g, $2 \cdot 10^{-7}$ g usw. Für jede Verdünnung benutzten wir eigene Kolben und Pipetten, die vor dem Versuch mindestens $\frac{1}{2}$ Stunde ausgekocht und zudem öfter in Bichromat-Schwefelsäure gereinigt wurden. Bei den für die Versuche in Frage kommenden Verdünnungen diente die Durchströmungsflüssigkeit (NSA-haltige Ringerlösung) als Verdünnungsmittel. Von der betr. ACh-Verdünnung wurden zum Versuch 0,5 ccm bzw. 1,0 ccm in den Stutzen N injiziert. Es werden also, und darauf sei besonders hingewiesen, jeweils definierte Mengen ACh der Lunge zugeführt, und nicht etwa die Lunge mit der betreffenden Verdünnung des ACh fortlaufend durchströmt.

Die Verdünnungsreihe setzten wir vor jedem Versuch frisch an und verwendeten besondere Sorgfalt auf gute Durchmischung. Die Fehlerbreite der Verdünnungsmethode dürfte bei sorgfältiger Ausführung und Gleichhalten der äußeren Bedingungen bei etwa ± 1 Zehnerpotenz liegen.

Ergebnisse und Diskussion

Bei dem weitaus größten Teil der Versuche wurde mit einer Ringerlösung durchströmt, der Nikotinsäureamid (NSA) in einer Konzentration von 10^{-4} zugesetzt war. Dadurch wurde eine wesentliche Besserung der Durchströmung der Lunge erreicht. Die Durchströmung mit Ringerlösung allein führt nämlich zu einer zunehmenden Gefäßverengung, die sich bis zum Durchströmungsstillstand steigern kann. NSA erweitert die Gefäße und garantiert so eine länger anhaltende, ausreichende Durchströmung der Lunge. Eine ähnliche Wirkung auf die Lungendurchströmung haben, wie wir zeigen konnten, Ronicol (β -Pyridylcarbinol von Hoffmann la Roche) und Adenosintriphosphat. Die Verwendung gerade von NSA hatte aber noch einen anderen Grund. Wir hatten früher gefunden, daß NSA die ACh-Empfindlichkeit der glatten Muskulatur der isolierten Lunge wesentlich steigert (Brecht¹⁴). Es war demnach zu vermuten, daß NSA auch in den vorliegenden Versuchen eine ähnlich sensibilisierende Wirkung ausüben könnte. Das scheint auch der Fall zu sein. Bei Durchströmung mit NSA-Ringerlösung waren auch in der Zeit abnehmender ACh-Empfindlichkeit

noch eher Effekte bei extremen Verdünnungen zu erhalten. Worauf diese Sensibilisierung beruht, ist noch ungeklärt. Die Cholinesterase wird durch NSA wohl nicht beeinflusst. Eine Sensibilisierung durch Physostigmin ist am Durchströmungspräparat der Lunge bei den hier zur Diskussion stehenden Verdünnungen nicht zu beobachten.

Es ist bekannt, daß NSA als Stoffwechselerferment in den Kohlenhydrat- und möglicherweise auch Eiweiß-Stoffwechsel der Zelle eingreift. An der glatten Muskulatur führen diese Vorgänge zu einer Dehnung der kontraktilen Elemente, wodurch offenbar günstigere Vorbedingungen für die Wirkung des ACh geschaffen werden.¹⁴

Die Anwendung von NSA bot für die vorliegende Untersuchungsreihe also zweierlei Vorteile: Begünstigung der Durchströmung und Sensibilisierung der Lunge. Unter diesen Voraussetzungen war es möglich, die Wirkung extremer ACh-Verdünnungen, über die hier ausschließlich berichtet werden soll, zu untersuchen. Zur Beobachtung der ACh-Effekte bedienten wir uns meist der Registrierung der Durchströmungsänderungen (Durchblutungs-minderung), in einem Teil der Versuche der Registrierung der Längen-änderungen der glatten Muskulatur der Lunge (Kontraktion) und in einer Anzahl von Versuchen schließlich kamen beide Methoden gleichzeitig zur Anwendung. Abb. 2 zeigt einen Versuch, bei dem die Durchströmung der

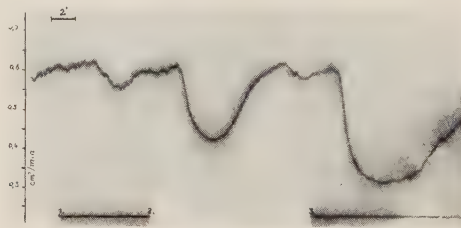


Abb. 2. (Versuch 38 B v. 14. 1. 49) Die Wirkung hoher ACh-Verdünnungen auf die mit NSA-Ringer durchströmte Lunge. Registrierung der Durchströmung der Lunge mit Druckdifferentialstromuhr. Bei 1 Zugabe von ACh $2 \cdot 10^{-20}$ g, bei 2 von ACh $2 \cdot 10^{-17}$ g, bei 3 von $2 \cdot 10^{-17}$ g jeweils in 1 ccm NSA-Ringer. Man sieht die immer stärker werdende Abnahme der Durchströmung mit zunehmender ACh-Menge. Eichung der Durchströmung in ccm/min. — Zeit 2 Minuten.

Lunge fortlaufend registriert wurde. Man sieht die immer größer werdende Abnahme der Durchflußmenge mit steigenden ACh-Mengen. Abb. 3 gibt das Verhalten der glatten Muskulatur der Lunge (Mechanogramm) bei der Einwirkung ähnlicher ACh-Mengen wieder. Die Lunge reagiert mit deutlichen Kontraktionen. Durch zwei „Leerversuche“ (Injektion von 1 ccm NSA-Ringerlösung, die dem Durchströmungsgefäß entnommen wurde) ist hier auch gezeigt, daß es sich tatsächlich nur um ACh-Effekte handeln kann.

Damit ist zunächst mit zwei verschiedenen Methoden demonstriert, daß solche extreme ACh-Verdünnungen offenbar eindeutige und gut nachweisbare Wirkungen entfalten können. Man muß sich fragen, ob solche Re-

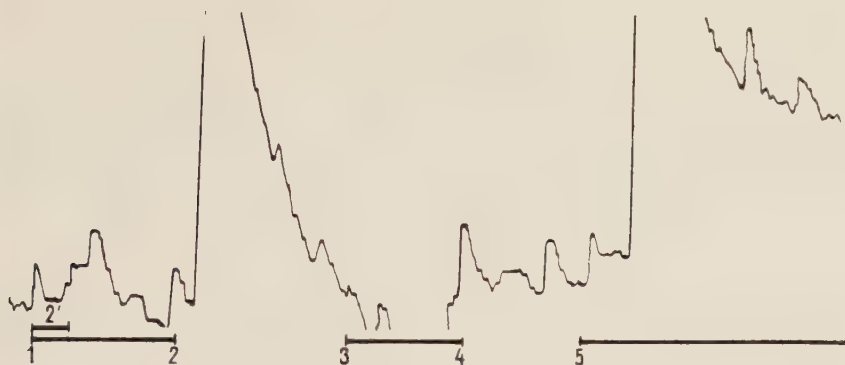


Abb. 3. (Vers. 49 v. 22. 3. 49). Die Wirkungen hoher ACh-Verdünnungen auf die glatte Muskulatur der mit NSA-Ringer durchströmten Lunge. Photoelektrisches Mechanogramm (Vergrößerung 1 : 45). Bei 1 Zugabe von ACh $2 \cdot 10^{-19}$ g, bei 2 von ACh $2 \cdot 10^{-17}$ g, jeweils in 1 ccm NSA-Ringer. Bei 5 Zugabe von ACh 10^{-17} g in 0,5 ccm NSA-Ringer. Bei 3 und 4 Zugabe von jeweils 1 ccm NSA-Ringer (Leerversuch), dabei keine Reaktion. Auf 1 hin erfolgt eine über die anfänglichen Spontankontraktionen hinausgehende Verkürzung, die möglicherweise auf ACh zurückzuführen ist. Auf 2 und 5 hin treten stärkere Kontraktionen ein, so daß die Kurve über den Rand ansteigt. Zeit 2 Minuten.

sultate theoretisch überhaupt noch wahrscheinlich sind. Entscheidend ist die schon oben getroffene Feststellung, daß auch in den extremsten Verdünnungen, mit denen einwandfreie Resultate erhalten wurden, noch Molekeln vorhanden sind. Es sind nämlich in 0,5 ccm der von uns angesetzten Verdünnungen enthalten:

bei 10^{-17}	\sim	30 000	Molekeln
„ 10^{-18}	\sim	3 000	„
„ 10^{-19}	\sim	300	„
„ 10^{-20}	\sim	30	„

(bei einer schon oben erwähnten wahrscheinlichen Fehlerbreite von ± 1 Zehnerpotenz). Unterhalb 10^{-20} waren sichere Wirkungen nicht mehr zu erhalten.

Zunächst zeigt das Experiment, daß bei einer gewissen Anzahl von Versuchen die Wirkung ausbleibt. Darüber gibt die nachstehende Tabelle Auskunft, in der sämtliche Versuche nach ihrem positiven oder negativen Ergebnis zusammengestellt sind. Daraus geht einmal hervor, daß die Empfindlichkeit der Lungen gegenüber ACh schwankt. Sie sind in der ersten Hälfte des Winters sensibler als in der zweiten. Das stimmt mit den von uns schon früher sowohl an der isolierten als auch an der in situ durchströmten Lunge gemachten Beobachtungen überein, wonach die ACh-Empfindlichkeit jahreszeitlich schwankt^{9, 14}. Ein Fortschritt in der Aufklärung dieses Befundes dürfte in der von uns gegebenen Deutung zu sehen sein, wonach als einer der wesentlichsten Faktoren für diese Empfindlichkeitsänderung die Ernährungslage der Tiere zu betrachten ist¹². Die Lungen von Tieren in gutem Ernährungszustand sind meist empfindlicher

Tabelle 1

Zahlenmäßige Zusammenstellung der Versuchsergebnisse bei Einwirkung geringster Acetylcholinmengen

ACh. in g	1. Periode (Nov. 48—Jan. 49)		2. Periode (Febr. 49—Apr. 49)	
	Anzahl der Versuche mit positiv. Ergebnis	negativ. Ergebnis	Anzahl der Versuche mit positiv. Ergebnis	negativ. Ergebnis
10—20	6	4	3	3
10—19	17	3	10	7
10—17	6	1	14	7

als die Lungen schlecht ernährter Tiere. Die einzelnen hieran beteiligten Faktoren sind allerdings noch zu wenig zu übersehen, als daß sie hier diskutiert werden könnten.

Es bestehen jedoch auch Empfindlichkeitsunterschiede zwischen Lungen von Tieren, die zur gleichen Zeit gefangen und untersucht wurden. Ein Teil der Lungen reagiert noch auf extreme ACh-Verdünnungen, der andere Teil aber nicht. Daß sie nicht immer reagieren müssen, hängt offenbar auch davon ab, daß Wirkungen der geringen Zahl von Molekeln nicht mehr mit Notwendigkeit sondern nur noch mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit eintreten können. Diese Wahrscheinlichkeit kann aus der zu geringen Zahl gleichwertiger Versuche nicht berechnet werden. Dagegen erhebt sich die Frage nach der Wahrscheinlichkeit der Trefferwirkung des Einzelmolekels auf die Wand, bzw. auf einen dort befindlichen Receptor bei seinem Weg durch die Lunge. Eine genaue Berechnung läßt sich allerdings auch hierüber schon deswegen nicht durchführen, weil die Strömung in der Lunge nicht laminar ist und die Kapillaren der Lunge auch nicht annähernd gerade sind sondern ein dichtes Netzwerk bilden, wie dies Abb. 4 veranschaulicht.

Wir haben nun unter der — für unseren Fall also nicht zutreffenden — Voraussetzung einer laminaren Strömung in einer geraden Kapillare die Brownsche Bewegung eines ACH-Moleküls in axialer Strömung berechnet.

Das von der Strömung mitgenommene Molekel erfährt infolge der Brownschen Molekularbewegung Abweichungen von seiner durch die jeweilige Strömungsrichtung gegebenen Bahn. Wenn man die Hydratation des Molekels vernachlässigt und die Gültigkeit des Stokesschen Gesetzes annimmt, so beträgt das mittlere Verschiebungsquadrat infolge der Brownschen Bewegung:

$$(1) \quad \frac{\Delta \bar{r}^2}{\Delta t} = 2 D, \text{ bzw. } (1 a): \Delta \bar{r}^2 = 2 D \cdot \Delta t \quad (\text{Einstein }^{15})$$

(t = Zeit, D = Diffusionskonstante, \bar{r} = mittl. Verschiebung)
Die Diffusionskonstante errechnet sich nach der Stokesschen Formel:

$$(2) \quad D = \frac{K \cdot T}{6 \pi \eta R}$$

(k = Boltzmannsche Konstante [erg. Grad⁻¹], T = Kelvintemperatur [Grad], η = dynamische Viskosität [$g \cdot cm^{-1} sec^{-1}$] des Lösungsmittels, R = Radius des gelösten Molekels [cm])

In einer gleichmäßig axial durchströmten Kapillare tragen zur Annäherung des Molekels an die Wand nur zwei zur Strömungsrichtung senkrechte Komponenten der Verschiebung bei. Es sei in der Kapillare ein rechtwinkliges Koordinatensystem so eingezeichnet, daß die Strömungsrichtung mit der Z-Achse zusammenfällt. Dann beträgt das mittlere Verschiebungsquadrat in Richtung jeder Koordinatenachse wegen der vorhandenen drei Freiheitsgrade der Bewegung:

$$(3) \quad \Delta \bar{x}^2 = \Delta \bar{y}^2 = \Delta \bar{z}^2 = \frac{1}{3} \Delta \bar{r}^2$$

da jede Verschiebungsrichtung gleich wahrscheinlich ist. Somit berechnet sich das Quadrat der mittleren Annäherung des Molekels an die Wand zu:

$$(4) \quad \Delta \bar{r}_1^2 = \Delta \bar{x}^2 + \Delta \bar{y}^2 = \frac{2}{3} \Delta r^2 \quad (\bar{r}_1 = \text{mittl. Annäherung})$$

und nach Einsetzen von (1 a):

$$(5) \quad \Delta \bar{r}_1^2 = \frac{4}{3} D \cdot \Delta t$$

bzw. die mittlere Annäherung an die Wand:

$$(6) \quad \Delta \bar{r}_1 = \sqrt{\frac{4}{3} D \cdot \Delta t}$$

Nach Einführen des Wertes für D aus (2) erhalten wir:

$$(7) \quad \Delta \bar{r}_1 = \sqrt{\frac{2}{9\pi} \cdot \frac{K \cdot T}{\eta \cdot R} \cdot V \cdot t} \text{ [cm]}$$

Den Radius des ACh-Molekels nehmen wir zu $\approx 5 \text{ \AA}$ an.

Die Einführung der Zahlenwerte ($T = 310$ Kelvingrad, $K = 1,38 \cdot 10^{-16}$ erg. Grad⁻¹, $\eta = 10^{-2} g \cdot cm^{-1} \cdot sec^{-1}$) ergibt den zahlenmäßigen Ausdruck für die mittlere Annäherung des ACh-Molekels an die Wand der Kapillare:

$$\Delta \bar{r}_1 = \sqrt{\frac{2}{9\pi} \cdot \frac{1,38 \cdot 10^{-16} \cdot 3 \cdot 10^2}{10^{-2} \cdot 5 \cdot 10^{-8}} \cdot 10^8 \cdot V \cdot t} \text{ [\mu]} = \sim 24 \sqrt{\Delta t} \text{ [\mu]} \quad *)$$

Daraus ergibt sich, daß das Molekel in einer Sekunde $\sim 20 \mu$ zurücklegen kann. Beispielsweise beträgt im Versuch der Abb. 2 die anfängliche Durchströmungsgeschwindigkeit — die in diesem Fall relativ hoch ist — ungefähr $0,6 \text{ cm}^3/\text{min}$. Das Gefäßvolumen der Lunge wurde von uns experimentell (mit Hilfe der Erythrocytenzählmethode) zu etwa 60 mm^3 gefunden. Es fließt also rund das Zehnfache des Lungenvolumens in einer Minute durch das Organ oder anders ausgedrückt, der Gefäßinhalt der Lunge wird in 6 sec. erneuert. Das Molekel wird den größten Teil dieser Zeit ($\sim 4-5$ sec.) im Kapillargebiet verweilen. Es kann in dieser Zeit einen durchschnittlichen Weg von $\sim 40 \mu$ zurücklegen. Es ist sehr wahrscheinlich,

*) Die Diffusionskonstante des ACh wurde auch experimentell direkt bestimmt. (Dr. Portzehl). Es ergab sich $D = 100 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$. Einsetzen dieses Wertes in unsere Ableitung ergibt: $\Delta \bar{r}_1 = 36 \cdot \sqrt{\Delta t} \text{ [\mu]}$, eine für uns grobe Berechnung hinreichend gute Übereinstimmung.

daß das Molekel mindestens einmal an die Wand stoßen wird, weil der mittlere Durchmesser der Kapillaren $\sim 10 \mu$ beträgt. In Wirklichkeit erhöht sich jedoch die Trefferwahrscheinlichkeit des Molekels auf die Wand sowohl durch die Turbulenz der Strömung als auch durch die netzförmige Anordnung der Kapillaren (s. Abb. 4). Wenn man annimmt, daß die ACh-empfindlichen Rezeptoren, deren Erregung sich irgendwie über einzelne Lungenabschnitte oder über die ganze Lunge ausbreitet, im Kapillarnetz

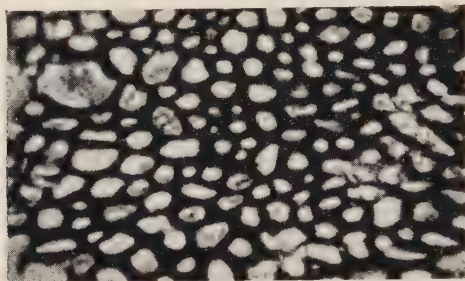


Abb. 4. Kapillarnetz der Froschlunge. Tuscheinjektion. Vergröß. 1 : 180.
(Präparat von Prof. Dr. Feneis, Tübingen).

liegen, so ist damit nicht einmal unbedingt zu verlangen, daß die Kapillärwände in ihrer Gesamtheit Rezeptoreneigenschaft besitzen. Es könnten nämlich auch nur ganz bestimmte Stellen der Kapillarwand als Rezeptoren wirken. Gerade dann werden bei extremen Verdünnungen Reaktionen nicht mehr mit Notwendigkeit, sondern nur noch mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit eintreten, wie dies auch tatsächlich der Fall ist. Das Auftreten von Effekten bei solch geringen ACh-Mengen läßt es unwahrscheinlich erscheinen, daß die spezifischen Rezeptoren in den größeren Gefäßen zu suchen sind.

Von besonderem Interesse ist die Betrachtung der *quantitativen* Verhältnisse der ACh-Effekte. Im Versuch der Abb. 2 z. B. nimmt die Durchströmung auf ACh $2 \cdot 10^{-17}g$ bis etwa auf die Hälfte ab. Es handelt sich also um Reaktionen, wie sie stärker auch kaum durch höhere Konzentrationen ausgelöst werden. Es fragt sich, wie dies möglich ist. Wenn man die Anzahl der getroffenen Rezeptoren für die Größe der Erregung verantwortlich macht, würde z. B. im Versuch der Abb. 2 bei $2 \cdot 10^{-20}g$ nur wenige, bei $2 \cdot 10^{-19}g$ bereits ein größerer Teil und bei $2 \cdot 10^{-17}g$ ein Großteil der Rezeptoren in Erregung geraten sein. Wenn man also die Besetzung der Rezeptoren als entscheidenden Faktor für die Größe der Gefäßreaktion ansieht, so ist verständlich, daß bei begrenzter Rezeptorenzahl mit zunehmender Molekelzahl relativ bald eine Annäherung an die maximale Reaktion erreicht werden kann. Eine Verschiebung des Empfindlichkeitsbereiches von Lunge zu Lunge wäre dadurch denkbar, daß entweder die Zahl der Rezeptoren individuell schwankt oder deren Empfindlichkeit größere Unterschiede zeigen könnte. Allerdings sind Bilder der Art der Abb. 2 relativ selten zu erhalten. Die Ursache dafür liegt in endogenen automati-

schen Erregungen der Lunge, die sehr häufig zu Spontankontraktionen sowohl der glatten Muskulatur der Lunge als auch der Gefäße führt. Die Mehrzahl der Lungen zeigt entweder schon bei Beginn der Durchströmung oder im weiteren Verlauf des Versuches mehr oder minder lebhaft Spontankontraktionen von Ausmaßen, die die durch ACh in Abb. 2 und 3 ausgelösten noch beträchtlich übersteigen können. Deshalb lassen sich nur solche Versuche auswerten, bei denen die Spontankontraktionen fehlen oder nur in geringem Ausmaß vorhanden sind. Die in der Tabelle angeführten Versuche genügten diesen Anforderungen; die Gesamtzahl der Versuche war weitaus höher.

Die Bereitschaft der Lunge zu solchen Spontankontraktionen läßt sich auch häufig an zunächst ruhigen Präparaten nach Einwirkung des ersten ACh-Reizes beobachten. Wie die Abb. 5 zeigt, kommt es dabei nicht zur Auslösung einer *einzelnen* Reaktion, sondern zu einer Serie rhythmisch aufeinander folgender Spontankontraktionen. An solchen spontan-aktiven Lungen ist es natürlich unmöglich, eindeutige Konzentrations-Wirkungskurven zu erhalten. Es kann nämlich ein ACh-Reiz entweder eine gerade ablaufende endogene Erregung verstärken und damit eine unverhältnismäßig große Wirkung hervorrufen, oder aber in eine Refraktärphase fal-

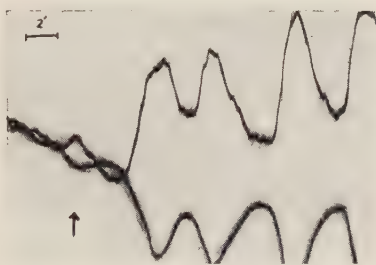


Abb. 5. (Vers. 46 A v. 25.1.49). Auslösung fortlaufender Spontanrhythmen auf ACh 10^{-10} g in 1 ccm NSA-Ringer (\rightarrow). Obere Kurve: Mechanogramm (Ausschlag nach oben: Kontraktion). Untere Kurve: Durchströmung (Abfall der Kurve: Abnahme der Durchströmung). Zeit 2 Minuten.

len und damit unwirksam werden. Aus diesen Gründen ist es auch nicht gelungen, das Lungendurchströmungspräparat zum quantitativen Nachweis extrem kleiner ACh-Mengen heranzuziehen, da Ergebnisse wie Abb. 2 nur unter besonders günstigen Umständen erhalten werden.

Bisher war lediglich davon die Rede, daß die Wirkung des auf dem Gefäßweg in die Lunge gebrachten ACh's sowohl durch Registrierung der Durchströmung (Vasokonstriktion) als auch des Mechanogramms (Kontraktion der Lunge) erfaßt werden kann, wenn man die Registriermethoden nur empfindlich genug macht. Unberücksichtigt blieb, ob diese beiden Vorgänge vielleicht in Beziehung zueinander stehen und in welcher. Dabei handelt es sich vorwiegend um die Beantwortung folgender Fragen: 1. Sind beide Systeme gleich hoch empfindlich gegenüber ACh? 2. Besteht eine Abhängig-

keit beider Vorgänge voneinander insofern, als die Reaktion der Gefäße eine solche der Lungenmuskulatur nach sich zieht und umgekehrt?

Es sei zunächst darauf hingewiesen, daß die Lungenmuskulatur beim Durchströmen der Lunge noch auf ACh-Konzentrationen anspricht, die um einige Zehnerpotenzen tiefer liegen, als die beim isolierten Lungenpräparat noch wirksamen höchsten Verdünnungen. Parallelversuche an isolierten Lungen oder isolierten Lungenstreifen im Ringerbad (Methode s. ¹⁴) zeigten nämlich einen Wirkungsbereich bis zu Verdünnungen von höchstens 10^{-14} — 10^{-16} nach Vorbehandlung mit NSA. Mit dieser Feststellung ist jedoch noch nicht entschieden, daß tatsächlich die Gefäßreaktion sensibler ist als die Reaktion der glatten Muskulatur, da über das Schicksal des einerseits auf dem Gefäßweg und andererseits von der Lungenoberfläche in die Lunge gelangenden ACh's zunächst noch nichts Sicheres ausgesagt werden kann.

Die gleichzeitige Aufzeichnung der Vasokonstriktion und der Kontraktion der glatten Muskulatur der Lunge mit hinreichender Geschwindigkeit zeigt, daß die Gefäßreaktion wesentlich früher eintritt als die Lungenkontraktion (s. Abb. 6). Somit kann die Abnahme der Durchströmung keines-

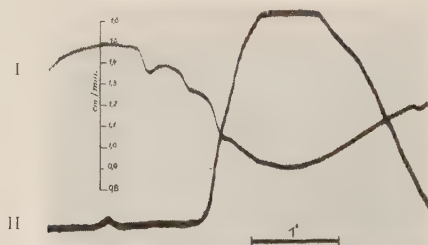


Abb. 6 (Vers. 52 v. 30. 4. 49) Gleichzeitige Registrierung der Durchströmung und Mechanogramm bei schneller Trommelumdrehung. Zugabe von ACh $2 \cdot 10^{-17}$ g in 1 ccm NSA-Ringer am Kurvenanfang. I = Durchströmung (Eichung in ccm/min.). II = Mechanogramm. Die Abnahme der Durchströmung beginnt etwa 1 Minute nach Zugabe des ACh's und setzt etwa $\frac{1}{2}$ Minute früher ein als die Lungenkontraktion. Zeit 1 Minute.

falls auf Kompression der Gefäße durch die sich kontrahierende Lungenmuskulatur beruhen. Das zeitliche Nachhinken der Muskelwirkung gegenüber der Gefäßreaktion ließe sich entweder durch eine indirekte Erregung der Muskulatur vom Gefäßsystem her oder durch Diffusion des ACh's durch die Kapillarwand zu außerhalb der Gefäße liegenden Angriffspunkten erklären. Es ist wegen der Absorption des ACh's an der Gefäßwand, der Schwierigkeit der Permeabilität und der Abbaumöglichkeit durch Cholinesterase unwahrscheinlich, daß bei der relativ geringen Zahl von ACh-Molekeln diese außerhalb des Gefäßsystems an nervöse oder muskuläre Elemente gelangen. Es bliebe also nur noch die Möglichkeit einer indirekten Beeinflussung der Muskulatur vom Gefäßsystem her offen. Der Gedanke an

einen solchen Mechanismus wird durch den schon früher von uns am Lungendurchströmungspräparat beschriebenen „Druckreflex“ nahegelegt⁹. Hierbei handelt es sich um die Beobachtung, daß künstliche Änderung der Durchströmungsgeschwindigkeit oder des Durchströmungsdruckes im Lungenkreislauf die glatte Muskulatur der Lunge beeinflussen können. Dieser „Druckreflex“ muß durch eine rein periphere Beziehung zwischen Gefäßen und glatter Muskulatur der Lunge, vielleicht nach Art eines „Axonreflexes“, zustandekommen und ist etwa mit dem „Pleuro-Pulmonalreflex“ vergleichbar⁷. Es könnte sich also bei dem hier geschilderten Befund um ähnliche Zusammenhänge handeln. Bei der Applikation des ACh auf dem Gefäßweg ist die Beeinflussbarkeit der Muskulatur anscheinend leichter, als bei der äußeren Einwirkung auf das isolierte Lungenpräparat. Dies könnte für den eben angedeuteten indirekten Wirkungsmechanismus sprechen, wenn man annimmt, daß der Angriffspunkt des ACh an der isolierten Lunge nicht im Gefäßapparat, sondern außerhalb desselben liegt. Diese Annahme wird noch dadurch bestärkt, daß bei der äußeren Anwendung im Bereich höherer ACh-Konzentrationen eine gewisse Abhängigkeit der Kontraktionsgröße von der Konzentration gefunden wurde (Brecht, Corsten, Lullies 8, Kaddatz 16, Hasselbach 17).

Aus den hier beschriebenen Befunden geht jedenfalls eine enge Beziehung zwischen der Durchströmungsgröße der Gefäße und dem Kontraktionszustand der glatten Muskulatur der Lunge hervor. Diese rein peripher regulierte Abhängigkeit des durch die glatte Muskulatur bestimmten Lungentonus von der Gefäßweite gewinnt unter dem Gesichtspunkt der Anpassung der respiratorischen Oberfläche der Lunge an die jeweilige Durchblutungsgröße eine besondere Bedeutung.

Zusammenfassung

Am Durchströmungspräparat der Froschlunge wurden die Einwirkungen extremer Acetylcholin-Verdünnungen auf die Durchströmung der Lunge (mit Hilfe einer Druckdifferentialstromuhr) und auf die Längenänderungen des Organs (mit einer photoelektrischen Registriermethode) untersucht. Dabei zeigte sich:

1. Unter günstigen Bedingungen und nach Vorbehandlung mit Nikotinsäureamid können noch ACh-Mengen von 10^{-17} g bis 10^{-20} g Abnahme der Durchströmung und Kontraktion der glatten Muskulatur der Lunge hervorrufen.
2. Die Treffermöglichkeit einzelner Molekeln wird mit Hilfe des Einsteinischen Verschiebungsquadrates wahrscheinlich gemacht. Ferner werden einige Fragen über den Wirkungsmechanismus des ACh diskutiert.
3. Die Beziehungen zwischen dem Verhalten der Durchströmung und dem der glatten Muskulatur der Lunge werden untersucht und eine peripher regulierte Abhängigkeit beider Systeme erörtert.*

* Der Firma Hoffmann-La Roche sind wir für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit und für die Bereitstellung der Substanzen zu besonderem Dank verpflichtet.

Literatur

- 1 Kögl, F., Naturw. **25**, 465 (1937) — 2 Fries, N. Über die Bedeutung von Wachstoffsstoffen für das Wachstum verschiedener Pilze. Uppsala 1938 — 3 Fries, N., Die Einwirkung von Adermin, Aneurin und Biotin auf das Wachstum einiger Ascomyceten. Uppsala 1943. — 4 Moewus, F., Biol. Zbl. **60**, 143 (1940) — 5 Rickes, E. L., N. G. Brink, F. R. Koninszy, Th. R. Wood, K. Volkers. Science **107**, 396 (1948) — 6 v. Muralt, A., Die Signalübermittlung im Nerven. Basel 1946. Dort auch weitere Literatur. — 7 Dijkstra, C. u. A. M. K. Noyons, Arch. internat. Physiol. **49**, 257 (1939) — 8 Brecht, K., M. Korsten, H. Lullies, Naturw. **28**, 351 (1940) — 9 Brecht, K., Pflügers Arch. **249/94** (1947) — 10 Lullies, H., Diskussionsbemerkung auf dem Physiologenkongreß 1948 in Frankfurt — 11 Fleisch, A., Abderhalden Hndb. d. biol. Arbeitsmeth. Abt. V **8**, 1007 f. — 12 Brecht, K. u. E. Feyrer, Pflügers Arch. **250**, 228 (1948) — 13 Barkan, Ph. Brömser u. A. Hahn, Z. Biol. **74**, 1 (1922) — 14 Brecht, K., Pflügers Arch. **246**, 553 (1943) — 15 Einstein, Ann. d. Phys. **17**, 1549 (1905) — 16 Kaddatz, Referat a. d. Physiologenkongreß 1948 i. Frankfurt — 17 Hasselbach, W., Inaug.-Diss. Marburg 1947

Zur Definition des Begriffes der Schlaftiefe

Von Edgar Wöhlisch, Würzburg

Eingegangen am 21. Juni 1949

Das klassische Verfahren zur Verfolgung des Verlaufes der Schlaftiefe ist die von E. H. Webers Schüler *Kohlschütter* ersonnene und in seiner Dissertation (1862) veröffentlichte Methode der Bestimmung des Weckreizes oder Schlaf-Schwellenreizes R_N , d. h. der kleinsten Reizstärke, die zum Erwecken der Vp. ausreichend ist. *Kohlschütter* bediente sich akustischer Reize. Von G. Endres und W. v. Frey wurden später auch Schmerz- und Druckreize verwendet. Diese beiden Autoren faßten den Flächeninhalt der Schlaftiefenkurve, den sie „Schlafmenge“ nannten, als ein Maß der durch den Schlaf bewirkten Erholung auf. Sie weisen in diesem Zusammenhange ganz richtig darauf hin, daß als ein im Vergleich zum Weckreiz strengeres Maß der Schlaftiefe der Überschuß des Weckreizes über die Reizschwelle im Wachzustande R_W , also die Differenz $\Delta R = R_N - R_W$ angesehen werden müsse; diese soll im Folgenden als der Reizschwellenzuwachs bezeichnet werden.

Bei sinnesphysiologischen Untersuchungen, also auch bei der *Kohlschütter*-schen Schlaftiefenbestimmung, werden die Reizstärken in physikalischen Einheiten ausgedrückt, die für die verschiedenen Sinnesgebiete verschiedene physikalische Dimensionen aufweisen. Der akustische Reiz besitzt die Dimension einer Arbeit (Einheit z. B. Grammgewicht \times Zentimeter), der Schmerzreiz weist dagegen die Dimension einer Kraft (Grammgewicht = Pond) auf. Die Größen R_N , R_W und $\Delta R = R_N - R_W$ sind also nicht dimensionslose, sondern benannte Zahlen. Dieser Umstand macht sie ungeeignet, als ein allgemein verwendbares Maß der Schlaftiefe zu dienen, da es mittels dieser Größen nicht möglich ist, verschiedene Sinnesgebiete hinsichtlich ihrer Schlaftiefe miteinander zu vergleichen; vergleichbar sind nur Größen der gleichen Dimension oder dimensionslose unbenannte Zahlen. Ob aber die verschiedenen Sinnesgebiete zur gleichen Zeit den gleichen Wert oder verschiedene Werte der Schlaftiefe aufweisen, diese Frage kann nicht von vornherein, sondern nur durch eine eigens darauf gerichtete Untersuchung beantwortet werden.

Ich habe deshalb in einer früheren Untersuchung über die Beziehungen zwischen Schlaftiefe und Erholung als die Schlaftiefe eines Sinnesgebietes

den dimensionslosen Quotienten aus Weckreiz und Wach-Schwellenreiz, d. h. den relativen oder reduzierten Weckreiz

$$D = \frac{R_S}{R_W}$$

angesehen. Eine erste Anwendung dieses Ausdruckes war die Vergleichung der mittleren Schlaftiefen des Schmerz-, Druck- und Gehörsinnes, wobei sich außerordentlich große Unterschiede ergaben, ein Resultat, das bisher offenbar unbekannt war (vgl. hierzu die untenstehende Tabelle). Weiterhin ließ sich mittels der Größe D eine theoretisch-mathematische Behandlung des Schlaftiefen-Erholungsproblems durchführen.

Wie mir indes neuere Überlegungen zeigten, stellt die Größe D nicht das letzte Wort in der Frage nach einer streng wissenschaftlichen Definition des Schlaftiefenbegriffes vor. Der Ausdruck für D ist mit einer störenden Eigentümlichkeit behaftet, die mehr ist als ein bloßer Schönheitsfehler. Für den Wachzustand, d. h. für den Fall $R_S = R_W$, nimmt nämlich der reduzierte Weckreiz den Wert $D = 1,0$ an. Von einer völlig einwandfreien Formulierung des Schlaftiefenbegriffes aber muß man wohl verlangen, daß die nach ihm errechneten Werte unbenannte Zahlen sind, die für die Schlaf-tiefe des Wachzustandes den Wert Null und nicht 1,0 ergeben.

Die Schlaftiefe eines Sinnesgebietes können wir auffassen als den Widerstand, den es dem Erwachen bei Einwirkung adäquater Reize entgegensetzt. Ihr Wesen ist offenbar nichts anderes als die Intensität der vom Schlafsteuerungszentrum dem zentral-nervösen Geschehen aufgedrückten Hemmung. Diese kann direkt nicht gemessen werden. Indirekt ermitteln wir sie nach der Methode der Weckreize. Als ein relatives Maß der Schlaftiefe, d. h. als eine ihr proportionale, aber nicht mit ihr identische Größe, betrachten wir den Reizschwellenzuwachs $\Delta R = R_S - R_W$, nicht den Weckreiz selbst. Hierin stimmen wir mit *Endres* und *v. Frey* überein. Der Reizschwellenzuwachs muß nun außer von der zeitlich variablen Schlaftiefe auch noch von der zeitlich konstanten spezifischen Erregbarkeit des betreffenden Sinnesgebietes bestimmt werden, die für ein Individuum eine Art physiologischer Materialkonstante vorstellt. Ein — wiederum relatives — Maß hierfür besitzen wir in der Wach-Reizschwelle. Je geringer die spezifische Erregbarkeit eines Sinnesgebietes bzw. je höher die ihr reziproke Wach-Reizschwelle R_W ist, desto größer muß der einer bestimmten Schlaftiefe T_S entsprechende Reizschwellenzuwachs $\Delta R = R_S - R_W$ sein. Um sich den Einfluß dieses Faktors zu verdeutlichen, bedenke man, daß beim Schwerhörigen mit seiner im Vergleich zum Normalhörigen hohen Wach-Reizschwelle zum Erwecken auch ein hoher Wert des Reizschwellenzuwachses erforderlich sein wird. Die Annahme, daß der Reizschwellenzuwachs ΔR jedem der beiden Faktoren R_W und T_S bei jeweiliger Konstanz des andern proportional sein wird, bringen wir zum Ausdruck durch die Schreibweise:

$$R_S - R_W = R_W \cdot T_S.$$

Da in Wirklichkeit R_W praktisch konstant und nur T_S zeitlich variabel ist, können wir R_W als den Proportionalitätsfaktor in der Beziehung ansehen, die den Reizschwellenzuwachs mit der Schlaftiefe verknüpft. Für die Schlaf-tiefe T_S folgt nunmehr:

$$\begin{aligned} T &= \frac{R_S - R_W}{R_W} \\ &= \frac{R_S}{R_W} - 1 \\ &= D - 1. \end{aligned}$$

Der neue Ausdruck für die Schlaftiefe stellt also den auf die Wach-schwelle reduzierten oder den in Vielfachen von ihr ausgedrückten Reiz-schwellenzuwachs im Schlafe vor. Die T_S -Werte sind ebenso wie die des reduzierten Weckreizes D unbenannte, dimensionslose Zahlen, so daß sie ebenso wie diese zum Vergleich der Schlaf-tiefen verschiedener Sinnesgebiete und zu theoretischen Betrachtungen über die Beziehungen zwischen Schlaf-tiefe und Erholungsgeschwindigkeit herangezogen werden können. Meiner älteren Auffassung, welche die Größe D als das eigentliche Schlaf-tiefenmaß ansah, ist die neue Formulierung darin überlegen, daß sie für den Wach-zustand ($R_S = R_W$, $D = 1,0$) wunschgemäß den Wert $T_S = 0$ ergibt. Für den Fall einer, z. B. pharmakologisch erzeugten Erregbarkeitssteigerung über die Norm hinaus ($R_S < R_W$) erhält man $T_S < 0$, also einen negativen Wert der Schlaf-tiefe, eine ebenfalls durchaus logische Aussage unserer Gleichung.

In der nachstehenden Tabelle finden sich in der Spalte D die bereits früher veröffentlichten arithmetischen Mittelwerte des mittleren reduzierten Weck-reizes, die damals als Mittelwerte der mittleren Schlaf-tiefe angesehen wur-den. In Spalte \bar{T}_S finden sich die aus \bar{D} sich ergebenden arithmetischen Mittel-werte der mittleren Schlaf-tiefe nach der neuen Auffassung dieses Begriffes. Allen Zahlen liegt die Berechnung des mittleren Weckreizes R_S aus dem Weckreiz-Zeitdiagramm zugrunde. Sie erfolgt in bekannter Weise durch planimetrische Integration nach der Beziehung

$$\bar{R}_S = \frac{1}{t_S} \int_0^{t_S} R_S(t) dt,$$

in der t die Zeit, t_S die Schlafdauer bedeuten. Hieraus ergibt sich dann

$$D = \frac{\bar{R}_S}{R_W}.$$

Die experimentellen Daten für Schmerz- und Drucksinn stammen von *Endres* und *W. v. Frey*, die für den Gehörsinn von *Mönninghoff* und *Piesbergen*, zwei Schülern des Physiologen *Vierordt*.

Tabelle 1

Sinnesgebiet	Arithmetisches Mittel	
	des mittleren reduzierten Weckreizes D	der mittleren Schlafftiefe $\bar{T}_S = \bar{D} - 1$
Schmerzsinn	5,2	4,2
Drucksinn	15	14
Gehörsinn	7625	7624

Die auf Grund der neuen Schlafftiefendefinition sich ergebende Korrektur ist also nur beim Schmerzsinn mit seiner niedrigen mittleren Schlafftiefe relativ nicht ganz unbedeutend.

Die Neuformulierung des Schlafftiefebegriffes wirkt sich auch auf die mathematische Fassung meiner Aufladungstheorie des Schlafes und der Erholung aus. Die Einführung der neuen Größe T_N in die Formeln der Theorie läßt sich leicht vornehmen, worauf noch mit einigen Worten eingegangen sei.

Nach der Grundannahme der Theorie werden Erholung und Ermüdung bzw. Aufladung und Entladung der Zellen des Zentralnervensystems mit einer für deren Funktion erforderlichen Speichersubstanz Φ durch zwei chemische Reaktionsgeschwindigkeiten bestimmt. Es sind dies:

1. die Bildungsgeschwindigkeit v_B
2. die Zerfallsgeschwindigkeit v_Z

des Stoffes. Von diesen wird die erstere als eine näherungsweise konstante, insbesondere von der Schlafftiefe unabhängige Größe, die letztere dagegen als eine Funktion der Schlafftiefe T_N aufgefaßt. Die nach Größe und Vorzeichen nach Maßgabe der Schlafftiefe wechselnde Ladungsgeschwindigkeit v_L des Speichers ist gleich der Differenz der beiden Reaktionsgeschwindigkeiten:

$$\frac{dx}{dt} = v_L = v_B - v_Z \quad (1)$$

In Übereinstimmung mit der Tatsache, daß zentrale Hemmungsvorgänge im Schlafgeschehen eine überragend wichtige Rolle spielen, bildet den Kern der Theorie die Vorstellung, daß die Aufladung im Schlafe und damit die Erholung durch eine Hemmung der energieliefernden Zerfallsreaktion zustande kommt, indem die Zerfallsgeschwindigkeit mit steigender Schlafftiefe abnimmt und schließlich kleiner wird als die Bildungsgeschwindigkeit. Dies muß nach einer Funktion erfolgen, die für unendlich große Werte der

Schlafentiefe T_s für v_z den Wert Null ergibt. Andererseits soll v_z für den Wachzustand ($T_s = 0$, $D = 1,0$) seinen Maximalwert annehmen, der als v_{ZW} bezeichnet sei. Diese Beziehungen zwischen v_z und T_s erfüllt die einfache Funktion

$$v_z = \frac{v_{ZW}}{T_s(t) + 1} \quad (2)$$

$$= \frac{v_{ZW}}{D(t)}.$$

Die Größe v_{ZW} stellt eine Konstante vor, nämlich die Zerfallsgeschwindigkeit im Wachen unter Grundbedingungen, d. h. im Zustande körperlicher und seelischer Ruhe. Die Substitution der Gl. (2) in Gl. (1) ergibt für die Ladungsgeschwindigkeit v_L eine einfache Differentialgleichung mit zwei Konstanten:

$$\frac{dx}{dt} = v_L = v_B - \frac{v_{ZW}}{T_s(t) + 1} \quad (3)$$

$$= v_B - \frac{v_{ZW}}{D(t)}.$$

Diese führt zu sinnvollen Aussagen über Aufladung und Entladung unter der selbstverständlichen Voraussetzung, daß die Zerfallsgeschwindigkeit im Wachen v_{ZW} stets größer ist als die Bildungsgeschwindigkeit v_B . Gl. (3) liefert z. B. für den Wachzustand als Ausdruck der in diesem Falle stattfindenden Entladung und Ermüdung einen negativen Sonderwert der Ladungsgeschwindigkeit, nämlich die Entladungsgeschwindigkeit im Wachen

$$v_{LW} = v_B - v_{ZW}.$$

Bezüglich der weiteren Einzelheiten der Theorie sei auf das Original verwiesen.

Nachtrag bei der Korrektur

Wenn in der obigen kurzen Darstellung der Aufladungstheorie von einer für die Funktion der Zellen des Zentralnervensystems erforderlichen Speichersubstanz Φ gesprochen wurde, so bedeutet dies eine Verallgemeinerung gegenüber der ursprünglichen spezielleren Annahme der Aufladung mit einem an freier Energie reichen Stoffe. Über die Möglichkeit einer noch allgemeineren Anwendung des mathematischen Formalismus der Aufladungstheorie hat sich kürzlich E. Wetterer in einem kritischen Referat folgendermaßen geäußert: „Sicherlich dürfte Wö.s Theorie manchen Einwänden ausgesetzt sein, deren gewichtigster darin bestehen könnte, daß für eine Fähigkeit des Nervensystems zur Speicherung von freier Energie im Sinne Wö.s bisher keine Anhaltspunkte vorliegen. Auch sind die oft diskutierten Ermüdungsstoffe von Wö. nicht berücksichtigt. Doch würde nach Ansicht des Referenten selbst eine Widerlegung der Energiespeicherung Wö.s Theorie nicht wertlos machen, da ebensogut ein funktionswichtiger Stoff gespeichert werden

könnte und daher die mathematischen Formulierungen unverändert blieben. Sogar die Ersetzung der „Energiespeicherung“ durch „Ermüdungsstoff-Abbau“ würde die Theorie nicht grundsätzlich ändern, da in den Formeln lediglich ein Vorzeichenwechsel einträte, indem v_L mit negativem Vorzeichen zum erholenden Vorgang und demgemäß v_B und v_Z in ihrer Bedeutung vertauscht würden. Vielleicht sind alle hier erörterten Möglichkeiten gleichzeitig verwirklicht und könnten durch Wö.s Formeln beschrieben werden. Man erkennt, daß eine quantitative Formulierung wesentlich mehr fruchtbaren Gehalt in sich bergen kann, als man ihr zunächst ansieht.“

Zusammenfassung

An eine wissenschaftlich einwandfreie Formulierung des Schlaf tiefenbegriffes, welcher die Berechnung von Schlaf tiefenwerten aus zwei meßbaren sinnesphysiologischen Größen, dem Schlaf-Weckreiz R_S und dem Wach-Schwellenreiz R_W gestattet, sind folgende Hauptanforderungen zu stellen:

1. Die Schlaf tiefenwerte müssen physikalisch dimensionslose unbenannte Zahlen vorstellen, so daß verschiedene Sinnesgebiete trotz der Verschiedenheit der physikalischen Dimensionen ihrer adäquaten Reize hinsichtlich ihrer Schlaf tiefe miteinander verglichen werden können.

2. Für den normalen Wachzustand muß die Formel den Schlaf tiefenwert Null ergeben.

Ein früher als Schlaf tiefenmaß verwendeter Ausdruck, der reduzierte Weckreiz $D = \frac{R_S}{R_W}$, erfüllt zwar die erste Bedingung, liefert aber für den Wachzustand die Schlaf tiefe 1,0.

Es wird ein verbesserter Ausdruck für die Schlaf tiefe abgeleitet. Diese wird als der auf den Wach-Schwellenreiz reduzierte Reizschwellenzuwachs im Schlafe definiert. Der neue Ausdruck lautet:

$$TS = \frac{R_S - R_W}{R_W} = \frac{R_S}{R_W} - 1 \\ = D - 1.$$

Er wird beiden Forderungen gerecht. Zustände übernormaler sinnesphysiologischer Erregbarkeit werden nach diesem Ausdruck logisch einwandfrei durch negative Werte der Schlaf tiefe gekennzeichnet.

Die früher veröffentlichten Daten für die Mittelwerte der mittleren Schlaf tiefe des Schmerz-, Druck- und Gehörsinnes erfahren an Hand der neuen Schlaf tiefendefinition eine kleine Korrektur.

Literatur

G. Endres u. W. v. Frey, Z. f. Biol. 90, 70 (1930) — E. Kohlschütter, Messungen der Festigkeit des Schlafes. Diss. Leipzig 1862; Z. f. ration. Med. 17, 209 (1863) — O. Mönninghoff u. F. Piesbergen, Z. f. Biol. 19, 114 (1883) — E. Wöhlisch, Auf ladungstheorie des Schlafes und der Erholung. In: L. R. Müller, Über den Schlaf, S. 68. Berlin-München 1948

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität München

Versuche mit radioaktivem Phosphor

Von Helmut Niemer

Mit 2 Tabellen

Eingegangen am 5. April 1944

Über die Verwendung von radioaktivem Phosphor als Indikator für biologische Umsetzungen sind in letzter Zeit mehrere Arbeiten erschienen. So haben *Hevesy* und *Parnas* radioaktives Phosphat, das aus radioaktiver Adenylsäure stammt, die zu gärender Hefe zugesetzt wurde, in den Zuckerphosphorsäureestern wiedergefunden. Ferner hat *Meyerhof* die Phosphorylierungsreaktionen der anaeroben Kohlehydratspaltung mit Hilfe von radioaktivem Phosphor (P^{32}) untersucht.

Am hiesigen Institut wurden nun unter Verwendung der kürzlich beschriebenen Methodik (*Niemer* und *Irintschew* [43]), mit der man einen großen Teil des in Nukleotiden eingebauten Phosphates bestimmen kann, Versuche unternommen, mit denen die Frage gelöst werden sollte, ob der lebende Organismus in der Lage ist, ein Angebot von Phosphat zum Aufbau obengenannter Verbindungen zu verwenden.

Versuchsanordnung

Ein Kaninchen wird gewogen und 2 Tage nach der Injektion von 400 mC radioaktivem Phosphor getötet und der Hinterschenkelmuskulatur eine Menge von ca. 200 g abpräpariert. Diese wird durch eine engporige Fleischmaschine getrieben. Der Muskelbrei wird zu gleichen Teilen mit 10 % Trichloressigsäure versetzt. Am nächsten Tage wird auf einer Porzellanannutsche abgesaugt und mit Trichloressigsäure nachgewaschen. Im Filtrat wird in der üblichen Weise das anorganische Phosphat als Magnesiumammoniumphosphat gefällt. Das Filtrat hiervon, welches die gebundenen organischen Phosphate enthält, wird nach Ansäuern mit Trichloressigsäure durch eine Al_2O_3 -Säule geleitet und die Blauzone eluiert. Diese wird nach Neumann aufgeschlossen. Die weitere Verarbeitung sowohl des anorganischen als auch des Phosphatanteiles, der aus den aufgeschlossenen Nukleotiden stammt, gestaltet sich wie folgt:

25 ccm Lösung (sie enthält ca. 0,1 g P_2O_5) werden in einem 500 ccm-Becherglas auf 50 ccm verdünnt. Man fügt zur Flüssigkeit 30 ccm einer Ammonnitratlösung,

die man durch Lösen von 70 g Ammonnitrat und 10–20 ccm 25 % Salpetersäure zu 200 ccm und Filtrieren der Lösung hergestellt hat, sowie 20 ccm konzentrierte Salpetersäure und erhitzt sie zum Sieden. Gleichzeitig erwärmt man 200 ccm Ammoniummolybdat (30 g Salz im Liter, nötigenfalls unter Zusetzen von wenig Ammoniak, gelöst, filtriert) in einem 2. Becherglas ebenfalls zum Kochen und läßt sie in dünnem Strahl zur Phosphorsäurelösung fließen. Man bedeckt dazu das erste Becherglas mit einem durchbohrten Uhrglas und steckt in dessen Öffnung einen aus einem Reagensglas gefertigten Trichter mit feiner Öffnung, durch die man die Molybdatlösung unter fortgesetztem Umschwenken des Becherglases zugeibt. Man läßt den Niederschlag eine halbe Stunde lang absitzen, gießt die überstehende Flüssigkeit durch ein 7-cm-Filter und dekantiert mit 50 ccm einer heißen Waschflüssigkeit, die man aus 100 ccm der oben erwähnten Ammonnitratlösung, 100 ccm 25 % Salpetersäure und 150 ccm Wasser bereitet hat. Nachdem man das Filtrat mit Ammoniummolybdat auf Vollständigkeit der Fällung geprüft hat, löst man den Niederschlag wieder auf, indem man durch das Filter 10 ccm 8 % Ammoniak zu der im Becherglas befindlichen Hauptmenge des Phosphormolybdates gibt. Man wäscht das Filter mit 30 ccm Wasser aus, fügt zur Lösung 20 ccm der früher dargestellten Ammonnitratlösung und 1 ccm Ammonmolybdatlösung hinzu, erhitzt die ammoniakalische Flüssigkeit zum Sieden und fällt daraus das Ammoniumphosphormolybdat zum zweitenmal, indem man durch den vorher benutzten Trichter 20 ccm heiße 25 % Salpetersäure zufließen läßt. Nachdem der Niederschlag über Nacht gestanden hat, filtriert man ihn in einem Goochtiegel < 4 und wäscht ihn mit der oben erwähnten, heißen Waschflüssigkeit aus, bis das Filtrat durch Kaliumferrocyanidlösung nur mehr schwach braun gefärbt wird. Der Niederschlag wird hierauf bei 160° getrocknet. 10–30 mg der Gesamtmenge werden auf einem 3 cm² Stanniolblättchen in gleichmäßiger Schichtdicke aufgetragen und mit einer Zellophanhaut beklebt. Mit diesem Präparat werden die Messungen der Radioaktivität gemacht.

Versuchsergebnisse

Verarbeitet wurde die Muskulatur von 1 Hund und 2 Kaninchen. Die Unterschiede der Strahlungswerte pro Gewichtseinheit erklären sich dadurch, daß von der Injektion des P³² bis zur Messung verschiedene Zeiten vergingen. Außerdem war natürlich die Strahlungsintensität der injizierten Präparate von vornherein und das Gewicht der behandelten Tiere unterschiedlich.

Tabelle 1

Nr.		Hund	Kaninchen	Kaninchen
1	Verarbeitete Muskelmenge (g)	150	193,5	114
2	Molybdat aus gebundenem PO ₄ (g)	2,12	2,29	1,08
3	Molybdat aus anorganischem PO ₄ (g)	25,3	17,6	11,4
4	Strahlung aus 2 T/Min.	18,7 · 10 ³	19,7 · 10 ³	7,0 · 10 ³
5	Strahlung aus 3 T/Min.	49,3 · 10 ⁴	38 · 10 ⁴	26,6 · 10 ⁴

Berechnet man nun den Anteil, den die Strahlung des Molybdates aus gebundenem Phosphat an der Gesamtstrahlung hat, so findet man beim

Hund 3,66, bei den Kaninchen 4,9 und 2,5 %. Die Menge des gebundenen Phosphates ist also relativ klein. Daneben bestehen auch recht erhebliche Unterschiede in den einzelnen Werten. Es liegt daher der Verdacht nahe, ob es sich bei den oben beschriebenen Versuchen überhaupt nicht um echte biologische Synthesen handele. Es wurden deshalb 2 Kontrollversuche gemacht, die hier Klarheit schaffen sollten. Es wurden je 100 g durch eine Fleischmaschine zerkleinerter Rindsmuskel mit einer gewissen Menge radioaktiven Phosphates in Lösung innig vermischt und ca. 3 Stunden stehen gelassen. Hierauf wurde der Ansatz in der gleichen Weise weiterverarbeitet wie oben beschrieben d. h. es wurde das anorganische Phosphat vom gebundenen getrennt und beide Teile nach Aufschluß zur Messung gebracht. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 2.

Tabelle 2

Nr.		Rind	Rind
1	Verarbeitete Muskelmenge (g)	100	100
2	Molybdat aus anorganischem PO_4 (g)	1,464	0,65
3	Molybdat aus gebundenem PO_4 (g)	13,74	6,6
4	Strahlung aus 2 T/Min.	$11,2 \cdot 10^2$	$12,4 \cdot 10^3$
5	Strahlung aus 3 T/Min.	$11,5 \cdot 10^4$	$75,9 \cdot 10^4$

Daraus ergibt sich der Anteil des gebundenen Phosphates an der Gesamtstrahlung zu 0,99 und 1,4 %. Diese Werte sind nun zwar rund halb so groß wie die früher aus den Tierversuchen erhaltenen, immerhin aber bedeutend genug, um einen wirklichen Einbau radioaktiven Phosphates in die Nukleinkörper des Muskels beim lebenden Tier zu bezweifeln. Es könnte sich mit der gleichen Wahrscheinlichkeit um bloße Adsorptionen handeln. Eine weitere Möglichkeit des Nachweises von radioaktivem Phosphor als mit dem Geiger-Müllerschen Zählrohr besteht leider nicht. Jedenfalls sind die Mengen radioaktiver Substanz, die zur Messung gelangen, derart klein (100 T/Min entsprechen $7 \times 10^{-8} \gamma$), daß es aussichtslos erscheint, die hier erwähnten Verbindungen in Reinheit zu isolieren.

Zusammenfassung

Es wurden bei der Verarbeitung eines gewöhnlichen Muskelbreiansatzes unter Zufügung von P^{32} größenordnungsmäßig die gleichen Resultate gefunden wie in einem Muskel, der von einem mit P^{32} injizierten Tier stammt.

Es kann also aus den obigen Tierversuchen nicht mit Sicherheit geschlossen werden, ob es sich um biologische Synthesen oder nur um Austausch von radioaktivem Phosphat gegen inaktives oder um eine Adsorption an die betreffenden Niederschläge handele.

Herr Dozent Dr. Roeder vom Serologischen Institut der Deutschen Forschungsanstalt für Psychiatrie führte in dankenswerter Weise die Messung der radioaktiven Präparate mit Hilfe des Geiger-Müllerschen Zählrohres durch.

Literatur

Hevesy u. Parnas, Hoppe-Seyler **251**, 261, 1938 — *Hevesy, Baranowski, Guthke, Ostern u. Parnas* mitgeteilt von *J. K. Parnas* in der Sitzung der Poln. Physiol. Gesellschaft, Abtl. Lwow am 1. 12. 1937 — *Meyerhof, Ohlmeyer, Gentner u. Maier*, Leibnitz, Bioch. Z. **298**, 396, 1938 — *Niemer u. Irintschew*, Z. Biol. **101**, 442, 1943

NEUERSCHEINUNGEN:

ENGEL

Angewandte Physiologie am Krankenbett

Ein Lehrbuch der pathologischen Physiologie

Von Prof. Dr. Rudolf Engel, Minneapolis (vorm. Aachen).

Mit 60 Abbildungen. XI, 245 Seiten. Halbleinen DM 20.—

Die erste Darstellung der pathologischen Physiologie, die seit dem Kriege in Deutschland erschienen ist. Ihre besondere Bedeutung beruht u. a. darauf, daß neben den eigenen reichen Erfahrungen des Verfassers und den Ergebnissen der deutschen Klinik auch das ausländische Schrifttum — zumal das englische und kanadische — berücksichtigt wird und damit der Anschluß an die internationalen Forschungsergebnisse wiederhergestellt ist.

v. TSCHERMAK-SEYSENEGG

Leitfaden der Physiologie

Von Prof. Dr. Armin v. Tschermak-Seysenegg, Regensburg.

Mit 191 Abbildungen. VIII, 312 Seiten. Kart. DM 12.—,

Halbleinen DM 15.—

Gestützt auf die Erfahrungen eines halben Jahrhunderts akademischer Lehrtätigkeit und grundlegende eigene Forschungsarbeiten gibt der Verfasser ein Bild des heutigen Standes der Physiologie. Das Buch umfaßt auf breitester Basis auch die zugehörigen physikalischen, physikalisch-chemischen und chemischen Grenzgebiete. — „Ein Leitfaden, dem man es ansieht, welch ein Riesenmaß von Gelehrsamkeit, Arbeitsfleiß und Akribie aufgeboten ist.“

Zu beziehen durch die Buchhandlungen

URBAN & SCHWARZENBERG / BERLIN UND MÜNCHEN

NEUERSCHEINUNGEN:

HESSE

Angewandte Pharmakologie

für Ärzte und Studierende der Medizin

*Von Prof. Dr. Erich Hesse, Hamburg. 3., neu bearbeitete
Auflage. Mit 58 Abbildungen. VIII, 445 Seiten. Ganzleinen
DM 23.—*

Dieses Buch liegt bereits in 3. Auflage vor. Es schlägt die Brücke zwischen der modernen Pharmakologie mit ihren Problemen und Forschungsergebnissen und der täglichen Arbeit des Arztes. Die Art der Darstellung, die immer wieder auf die Verbindungen zur pathologischen Physiologie Bezug nimmt, zeigt dabei neue Gesichtspunkte und verleiht damit dem Buch seine besondere Bedeutung auch für den Pharmakologen, den Physiologen und für den Vertreter anderer Spezialgebiete.

KOWARSKI

Klinische Mikroskopie

Atlas und Leitfaden

*Von Prof. Dr. Albert Kowarski. 2. Aufl., neu bearbeitet
von Dr. Josef Tillmanns, Berlin. Mit 14 Bildern im Text
und 309 größtenteils farbigen Bildern auf 80 Tafeln.
XVI, 178 Seiten. Gebunden DM 60.—*

Als heute unentbehrliches Hilfsmittel der klinischen Diagnose umfaßt das Buch in knapper und instruktiver Form die mikroskopischen Untersuchungen von Se- und Exkreten, Blut, Punktionsflüssigkeiten sowie Krankheitsprodukten bei Haut- und Geschlechtskrankheiten. In seinem hervorragenden Tafelwerk in naturgetreuen Farben ist durch die Nebeneinanderstellung der in Betracht kommenden Gebilde vor allem auch Wert darauf gelegt worden, daß eine Verwechslung der zufälligen Beimischungen des zu untersuchenden Materials mit den diagnostisch wichtigen Gebilden vermieden wird. Bereits in 2. Auflage vorliegend, gilt das Buch als eines der besten seiner Art.

Zu beziehen durch die Buchhandlungen

URBAN & SCHWARZENBERG / BERLIN UND MÜNCHEN